

解制御に関する研究

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻 薬学専門プログラム

生体機能分子動態学研究室

平成 26 年度入学 山頭 征岳

主指導教員 太田 茂

# 目次

## 略語一覧

第 1 章 序論	1
第 2 章 肝細胞スフェロイドにおける CYP3A 発現量評価	5
第 1 節 緒言	
第 2 節 スフェロイドにおける CYP3A1/23 タンパク質発現量の評価	
第 3 節 CYP3A1/23, 3A2 の経時的な mRNA, タンパク質発現量の評価	
第 4 節 CYP3A9, 3A18 の経時的な mRNA 発現量の評価	
第 5 節 小括	
第 3 章 アセトアミノフェンが CYP3A1/23 に及ぼす影響	11
第 1 節 緒言	
第 2 節 APAP が CYP3A1/23 mRNA, タンパク質、CYP3A 酵素活性に及ぼす影響	
第 3 節 APAP が CYP3A1/23 タンパク質半減期に及ぼす影響	
第 4 節 APAP がユビキチンプロテアソーム系に及ぼす影響	
第 1 項 APAP がプロテアソーム活性に及ぼす影響	
第 2 項 APAP が CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化に及ぼす影響	
第 3 項 APAP が CYP3A1/23 の E3 リガーゼに及ぼす影響	
第 4 項 APAP が gp78 mRNA 発現量に及ぼす影響	
第 5 節 APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制における NAPQI, ROS の影響	
第 1 項 APAP, ABT, <i>N</i> -acetyl-L-cysteine (NAC) 曝露後の細胞内 GSH の測定	
第 2 項 ABT が APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制に及ぼす影響	
第 3 項 NAC が APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制に及ぼす影響	
第 6 節 小括	
第 4 章 アセトアミノフェン構造類縁体が CYP3A1/23 に及ぼす影響	27
第 1 節 緒言	
第 2 節 AMAP が CYP3A1/23 に及ぼす影響	
第 3 節 AOAP が CYP3A1/23 に及ぼす影響	
第 4 節 PAcBA が CYP3A1/23 に及ぼす影響	
第 5 節 小括	

第 5 章 考察および総括	33
実験の部	37
引用文献	51
本論文の基礎となる原著、本論文に関連した学会発表	61
謝辞	62

## 略語一覧

2-AcHQ : 2-acetamidohydroquinone

ABT : 1-aminobenzotriazole

AMAP : *N*-acetyl-*m*-aminophenol

ANF :  $\alpha$ -naphthoflavone

AOAP : *N*-acetyl- $\sigma$ -aminophenol

APAP : acetaminophen

APBQ : 2-acetamido-*p*-benzoquinone

CAR : constitutive androstane receptor

CHIP : C terminus of Hsp70-interacting protein

CHX : cycloheximide

CYP : cytochrome P450

DDEP : 3,5-Dicarboethoxy-2,6-dimethyl-4-ethyl-1,4-dihydropyridine

ERAD : endoplasmic reticulum related degradation

Gp78 : glycoprotein 78

GSH : reduced glutathione

GST : Glutathione *S*-transferase

LC/ESI-MS : liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry

MBI : mechanism-based inhibition

MFN1 : mitofusin 1

NAC : *N*-acetyl-L-cysteine

NAPQI : *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine

PAcBA : *p*-acetamidobenzoic acid

PKA : protein kinase A

PKC : protein kinase C

PXR : pregnane X receptor

ROS : reactive oxygen species

SD rat : sprague-dawley rat

SULT : sulfotransferase

TAO : triacetyloleandomycin

Ub : ubiquitin

UGT : UDP-glucuronosyltransferase

$\beta$ -2-m :  $\beta$ -2-microglobulin

## 第 1 章 序論

一つの新薬が出来るまでに要する期間は一般的に 10 ～ 20 年と言われており、その費用は数百億円に上ることから、開発中止のリスクを回避、低減することは非常に重要である。現在、開発中止の要因として前臨床段階における化合物の毒性が報告されており、1990 年代における要因であった薬物動態・生体内の有効性による開発中止の事例は減少傾向にあるものの、未だに第一相臨床試験における中止の原因としてそれらは重要な位置を占めている (Kola and Landis, 2004; Waring *et al.*, 2015)。

開発中止を余儀なくされた医薬品の薬物動態における問題点として、(1)：吸収の悪さや血中半減期の短さにより、薬理活性を示すほどの十分な血中濃度が得られないこと (2)：薬物間相互作用により目的医薬品の血中濃度が著しく変動し、毒性発現するほど血中濃度が上昇する、もしくは薬理活性を示さないほど血中濃度が低下することなどが挙げられる。これら問題点には「薬物代謝」が大きく関与していることから、ヒトにおける薬物代謝プロファイルを正確に予測することが医薬品開発に求められており、昨今の薬物動態予測技術の向上が開発中止の要因の移り変わりに大きく寄与していると考えられる。

現在、ヒトの薬物代謝プロファイルを予測する手法として、マウス、ラット、イヌ、サルなどを用いた古典的な *in vitro*, *in vivo* 試験のみならず、その種差の壁を超えるためにヒトの初代肝細胞や肝ミクロソームなどを用いた *in vitro* 試験、さらにはマウス肝細胞がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞移植キメラマウスによる *in vitro*, *in vivo* 試験が実施されている。しかし、ヒトの代謝プロファイルの予測においてそれらの試験には懸念される課題がいくつか存在する。例えば、ヒト初代肝細胞を用いた試験では入手が容易である凍結肝細胞が一般的に用いられているが、その薬物代謝酵素活性は時間の経過と共に急速に減少していくため、肝臓からの肝細胞単離の工程を考えると、生体内の酵素活性を正確に反映していない可能性がある (Gómez-Lechón *et al.*, 2010)。また、ヒト肝細胞移植キメラマウスは多くの医薬品の体内動態パラメータにおいてヒトと良好な相関を示すことが報告されているが、残存するマウス肝細胞の影響により、一部その相関を外れる化合物が存在している (Sanoh *et al.*, 2015)。このように、完璧にヒトの薬物代謝プロファイルを予測することは難しく、様々なアプローチを用いてその予測の乖離を埋めようと試みている。

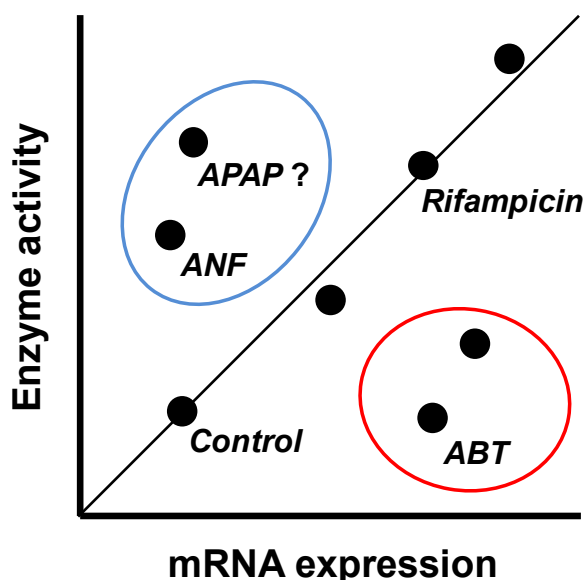
近年では、酵素活性が急速に失われる問題に対する解決策として、細胞工学に基づいた「三次元培養系」が開発されている。この三次元培養系は生体内の肝臓の状態に着目しており、肝細胞同士が凝集することで生体内の細胞間コミュニケーションを模倣した「スフェロイド培養系」やバイオリアクターを用いて培養液を循環させることで、絶えず肝細胞へ新鮮な培地を供給することに焦点を当てた「灌流培養系」などが考案され、従来の単層培養系と比較して長期培養に適応可能であることが報告されている (Dash *et al.*, 2009;

Meng, 2010)。当研究室では、ラット初代肝細胞のスフェロイド培養系を用いた研究を行っており、第Ⅰ相薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) や第Ⅱ相薬物代謝酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT), sulfotransferase (SULT) の培養期間に伴う mRNA 発現量を評価している。その結果、CYP3A1/23, UGT1A1, 2B1, SULT1A1 は播種前の肝細胞の mRNA 発現量を高い水準で維持していた (Sanoh *et al.*, 2014)。また、医薬品の代謝活性化に伴う毒性評価においても、反応性代謝物が原因で肝障害を示すことが知られる acetaminophen (APAP) を用いて評価可能であることや抗ヒスタミン薬である loratadine が CYP による代謝活性化を受けて desloratadine を生成し、それが薬剤誘発性リン脂質症と呼ばれるリン脂質の異常蓄積を引き起こすことを既に報告している (Sanoh *et al.*, 2014; Takagi *et al.*, 2016)。

CYP ファミリーは医薬品の代謝に大きく関与している薬物代謝酵素であり、その中でも CYP3A サブファミリーは CYP で代謝される医薬品の中で最も寄与が大きいことが報告されている (Zangar and Schwab, 2013; Cerny, 2016)。そのため、先述した薬物間相互作用の観点から医薬品候補化合物の CYP3A 活性に及ぼす影響を評価することは重要である。CYP3A の発現制御メカニズムとして、核内受容体である pregnane X receptor (PXR) や constitutive androstane receptor (CAR) が化合物によって活性化され、転写を促進し、酵素誘導することが一般的に知られている。その代表例として、抗生物質である rifampicin は PXR と直接結合し、CYP3A4 の転写を活性化すること (Luo *et al.*, 2002) や抗てんかん薬である phenobarbital は上皮成長因子受容体シグナルを抑制することで CAR を間接的に活性化し、CYP3A4 の転写を促進することが報告されている (Mutoh *et al.*, 2013)。また、ヒト初代肝細胞において典型的な酵素誘導剤を曝露したところ、CYP3A4 は mRNA 発現量と酵素活性に良好な相関関係を有することが明らかとなっている (Richert *et al.*, 2009)。しかし、この良好な相関関係を外れる化合物もいくつか存在する。1-aminobenzotriazole (ABT) は代謝物が CYP ファミリーが含有するヘム鉄に不可逆的に結合して酵素活性を阻害する一方で、CAR の活性化を介して CYP3A4, 2B6 の転写を促進することが報告されている (Yang *et al.*, 2010)。また、 $\alpha$ -naphthoflavone (ANF) は肝ミクロソームにおいて CYP3A4 タンパク質をアロステリックに調節することで、CYP3A4 の基質の代謝を促進することが報告されている (Davydov *et al.*, 2013)。

APAP はマウスにおいて CYP3A11 mRNA 発現量を若干上昇させるものの、CAR ノックアウトマウスにおいては発現上昇が確認されないことから APAP は CAR を介して CYP3A を酵素誘導する可能性が示唆されている (Zhang *et al.*, 2002)。しかし、別のグループの研究ではマウスにおいて APAP は CYP3A タンパク質発現量は上昇させるが、CYP3A11 mRNA 発現量に影響を与えないという報告もある (Wolf *et al.*, 2005)。また、ラットにおいて APAP は CYP3A タンパク質発現量、酵素活性を上昇させる報告があり (Kim *et al.*, 2007)、これらの結果を踏まえると、APAP は CYP3A の転写を促進するだ

けでなく、タンパク質の分解を抑制し、ターンオーバーを遅らせることで酵素活性を上昇させている可能性が考えられる (Fig.1-1)。しかし、CYP3A タンパク質の分解抑制により酵素活性の上昇を引き起こす化合物の報告はほとんどなく、そのメカニズムは未だ不明である。



**Fig. 1-1 Correlation between enzyme activity and mRNA expression of CYP3A4 under exposure to several chemical compounds (Conceptual figure)**

生体内のタンパク質の主な分解経路はユビキチンプロテアソーム系もしくはオートファジー系であることが分かっている。前者ではユビキチン (Ub) と呼ばれる分解シグナルタンパク質が E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素) および E3 (ユビキチンリガーゼ) の連続的な酵素反応により標的タンパク質に複数個付加された後、プロテアソームと呼ばれる分解を担う酵素複合体に運ばれ、選択的な分解が行われる (Cohen-Kaplan *et al.*, 2016)。一方、後者は自食作用とも呼ばれ、細胞質成分をリソソームで分解するための分解機構である。オートファジーは 3 種類に分かれており、(1): マクロオートファジー (オートファゴソームが比較的大きな分子量の細胞質成分を囲い込みリソソームと結合することで分解する) (2): シャペロン介在性オートファジー (シャペロンタンパク質が選択的に基質をリソソームに導き、分解する) (3): マイクロオートファジー (リソソーム自身が分子量の小さな細胞質タンパク質を分解する) が存在する (Cohen-Kaplan *et al.*, 2016)。どちらの分解系も外部からのストレス負荷時に障害を受けたタンパク質の分解に大きく関与しており、細胞内の恒常性を保つために必要な機構である (Vilchez *et al.*, 2014)。

CYP3A は 1 回膜貫通型の小胞体膜タンパク質であり、生理学的条件下におけるラット

CYP3A の半減期は 10 h 前後であることが明らかにされている (Shiraki and Guengerich, 1984; Watkins *et al.*, 1986; Correia, 1991)。また、生理学的条件下および外部ストレスによる損傷を受けた状態の両方においてユビキチンプロテアソーム系で分解されることや (Faouzi *et al.*, 2007)、その分解に働く E3 も近年報告されてきており (Kim *et al.*, 2010)、分解系に関する知見も少しずつ明らかになってきている。

既存の報告では CYP3A の化学物質による酵素誘導メカニズムに関して、転写促進による報告が大半を占めている。しかし、APAP が CYP3A タンパク質のターンオーバーを遅らせている可能性があることから、著者は APAP が CYP3A の分解に働くタンパク質に作用することで酵素活性の上昇を引き起こしているという仮説を立てた。この仮説が証明されれば、これまでに知られている酵素誘導とは異なる観点からの報告となり、既存の mRNA 発現量の上昇とは異なる新しい概念の薬物間相互作用の事例となり得ることが考えられる。しかし、単離後の肝細胞では CYP3A タンパク質発現量は安定的に維持されないため、APAP が CYP3A タンパク質に及ぼす影響を評価することは難しい。そこで、CYP3A1/23 mRNA 発現量を安定的に維持することが可能であるラット初代肝細胞スフェロイドに APAP を曝露し、タンパク質分解系に焦点を当てて、CYP3A タンパク質発現上昇を引き起こすメカニズムの解明を目指した (Fig.1-2)。

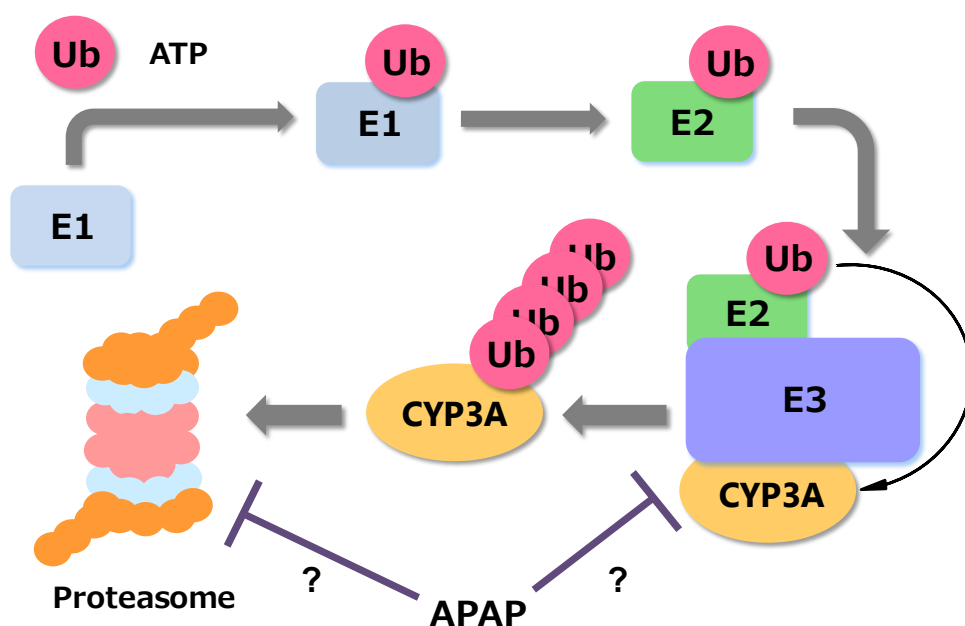


Fig. 1-2 Hypothesized mechanism of CYP3A induction by APAP



## 第 2 章 肝細胞スフェロイドにおける CYP3A 発現量評価

### 第 1 節 緒言

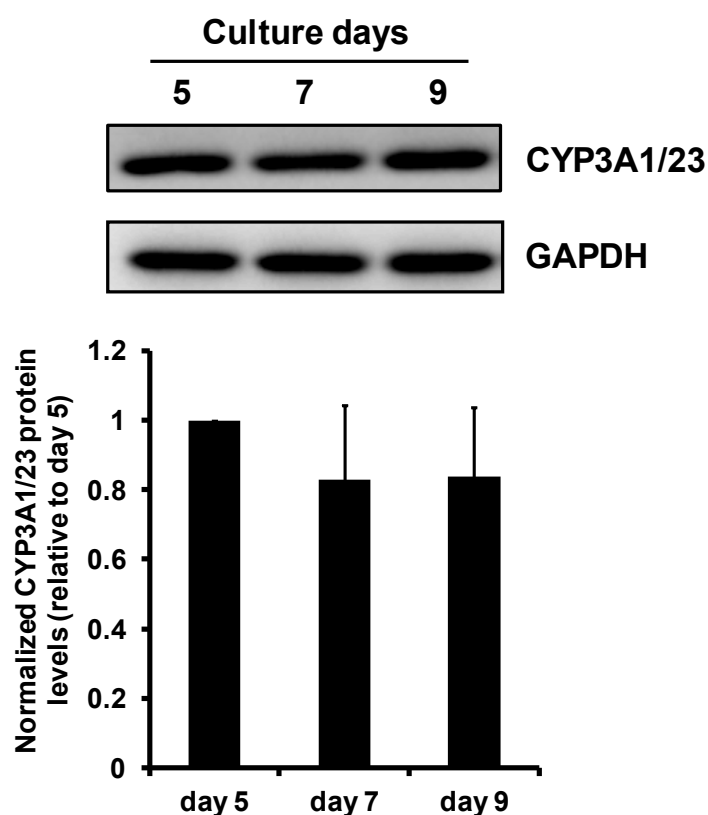
ヒトには 4 種類の CYP3A サブファミリー (CYP3A4, 3A5, 3A7, 3A43) が発現している。その中でも CYP3A4 は肝臓において最も多く発現している分子種であり、医薬品の代謝に大きく関与していることが報告されている (Martignoni *et al.*, 2006)。

ラットの肝臓にもヒトと同様に 4 種類の主要な CYP3A サブファミリー (CYP3A1/23, 3A2, 3A9, 3A18) が発現しているが、これらの中には発現量に性差や発達段階による違いがある分子種が存在することが報告されている (Mahnke *et al.*, 1997)。例えば、CYP3A2 は成熟した雄に特異的に発現し、雌ではほとんど発現していないことや CYP3A18 は雄において発現が高いこと (Robertson *et al.*, 1998)、さらに CYP3A9 は発達段階の進行に伴いその発現は上昇し、成熟期では雌の方が雄よりも発現量が高いことなどが挙げられる。その一方で、CYP3A1/23 は性差や発達段階に依存しない分子種であることが示されており、APAP に対する親和性が高い酵素であることから (Patten *et al.*, 1993)、本研究では CYP3A1/23 に着目した。

当研究室ではラット初代肝細胞スフェロイドにおける様々な薬物代謝酵素の mRNA 発現量の評価してきたが、タンパク質発現量は未だに評価していない。そこで、本章では肝細胞スフェロイドにおける CYP3A サブファミリーの mRNA およびタンパク質発現量进行评估した。

## 第 2 節 スフェロイドにおける CYP3A1/23 タンパク質発現量の評価

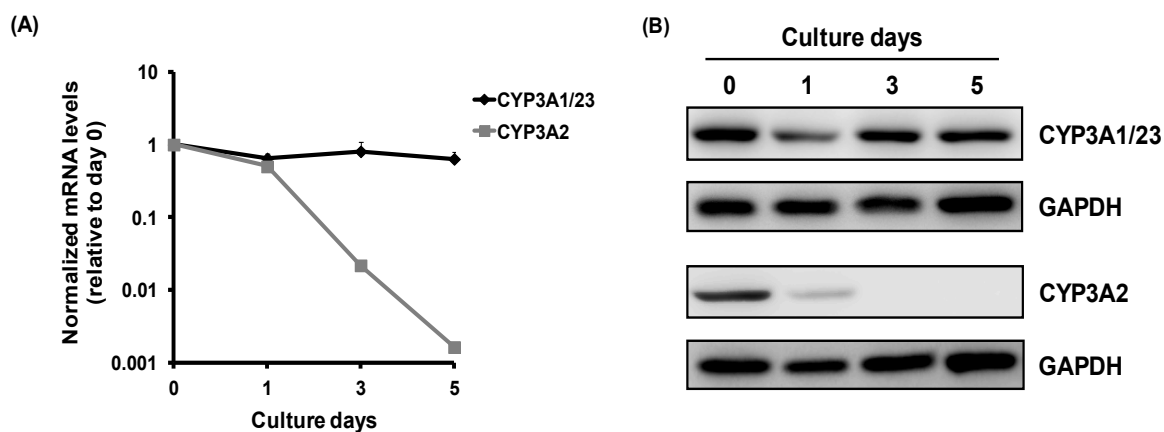
スフェロイド培養を可能にする Elplasia™ (Kuraray Co., Ltd.) と呼ばれる培養プレートに 7 週齢の雄性ラットから単離した初代肝細胞を播種した。培養 5 日目に細胞同士が凝集して形成したスフェロイドを RIPA buffer により回収し、その後培養 7 日目と 9 日目においても同様に回収した。Western blotting により CYP3A1/23 タンパク質発現量を評価したところ、培養 5 日目から 9 日目においてタンパク質発現量は維持されており、mRNA 発現量と同様の結果が得られた (Fig. 2-1)。



**Fig. 2-1 CYP3A1/23 protein levels in hepatocyte spheroids during culture.** Rat hepatocyte spheroids were harvested at days 5, 7, and 9. Representative results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments).

### 第 3 節 CYP3A1/23, 3A2 の経時的な mRNA, タンパク質発現量の評価

APAP が CYP3A 酵素活性に影響を及ぼすことを考慮に入れた時に、雄性ラットの肝臓において発現量の高い CYP3A1/23 と CYP3A2 の寄与を区別する必要があることから、CYP3A2 の発現量を評価しておく必要がある。そこで CYP3A1/23, 3A2 mRNA 発現量とタンパク質発現量を比較し、肝細胞スフェロイドにおける CYP3A 酵素活性の寄与を評価した。その結果、CYP3A1/23 mRNA 発現量は培養 5 日目まで安定的に維持していたのに対して、CYP3A2 mRNA 発現量は培養 5 日目には約 1/1000 であった (Fig. 2-2A)。また、タンパク質発現量も同様に CYP3A1/23 では維持されていたのに対して、CYP3A2 ではほとんど発現していないことが示された (Fig. 2-2B)。

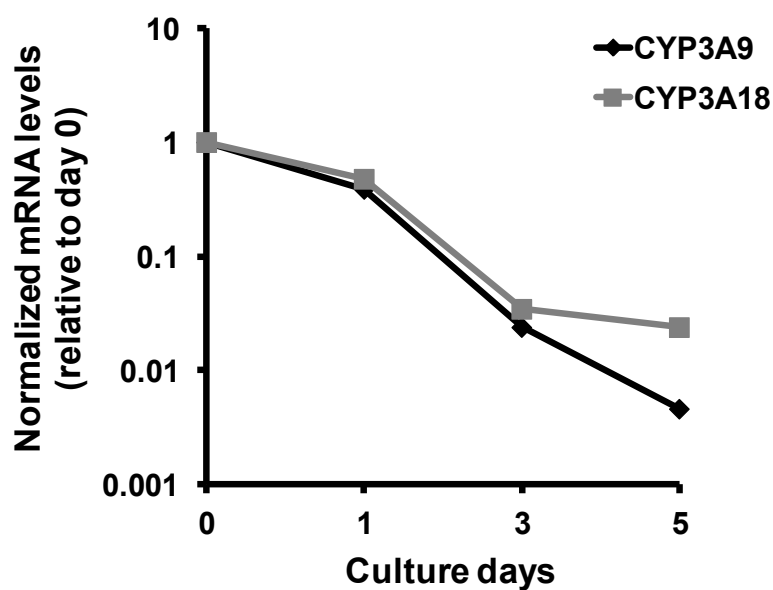


**Fig. 2-2 Changes in CYP3A1/23 and CYP3A2 mRNA and protein levels during culture.**

(A) CYP3A1/23 and CYP3A2 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses. CYP3A1/23 mRNA and CYP3A2 mRNA levels were normalized to  $\beta$ -2-microglobulin ( $\beta$ -2-m) mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments). (B) Results of CYP3A1/23, CYP3A2 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown. GAPDH was measured as a loading control. (n=1).

#### 第 4 節 CYP3A9, 3A18 の経時的な mRNA 発現量の評価

CYP3A9, 3A18 の発現量は 7 週齢雄性ラットの肝臓において低いものの、CYP3A 酵素活性に寄与している可能性があることから、その mRNA 発現量を前節と同様に経時的に評価した。その結果、CYP3A9 mRNA 発現量は培養 5 日目にはおよそ 1/200 であり、CYP3A18 mRNA 発現量はおよそ 1/50 であったことからどちらもスフェロイド培養系においてほとんど発現していないことが示された (Fig. 2-3)。



**Fig. 2-3 Changes in CYP3A9 and CYP3A18 mRNA levels during culture.** CYP3A9 and CYP3A18 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses. CYP3A9 mRNA and CYP3A18 mRNA levels were normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means. (n=2 independent experiments).

## 第 5 節 小括

本スフェロイド培養系において CYP3A1/23 mRNA, タンパク質発現量は維持されていたが、それ以外の 3 種類の CYP3A サブファミリーの発現はほとんど確認されなかった。緒言でも触れたように、CYP3A1/23 と 3A2, 3A9, 3A18 の大きな違いは遺伝子発現に関して性差の影響を受けるか否かという点である。そのため、スフェロイド培養において発現を維持できていない理由として、3 種のサブファミリーでは細胞間コミュニケーションよりも性ホルモンにより強く遺伝子発現調節を受けており、*in vitro* 細胞培養系では生体内における性ホルモンの影響を再現できていないことが考えられる。

性ホルモンの影響と CYP3A2, 3A9, 3A18 の発現量に関する考察として、亜鉛欠乏食 (1 µg zinc / g diet) を雄性ラットに思春期前から食べさせたところ、思春期後に雄で発現量の高い CYP3A2, 3A18 は減少し、逆に発現量の低い CYP3A9 が上昇したという報告がある (Xu *et al.*, 2001)。亜鉛は必須微量ミネラルであり、数多くのホルモンの生産、貯蔵、分泌において重要な役割を担っている。例えば、思春期および成熟期の雄性ラットに亜鉛欠乏食を食べさせると、対照群と比較して血漿中の成長ホルモンが有意に減少することや (Root *et al.*, 1979)、亜鉛欠乏食により、血漿中のテストステロンが減少することが報告されている (Xu *et al.*, 2001)。また、去勢した雄性ラットでは対照群と比較して CYP3A2 mRNA 発現量が減少しており、去勢したラットにテストステロンを投与すると減少していた発現量が上昇するという報告もある (Ribeiro and Lechner, 1992)。これらの結果を踏まえるとテストステロンの減少が CYP3A2, 3A18 mRNA 発現量が減少したメカニズムの要因だと考えられる。しかし、当研究室でもこれらの論文を参照してスフェロイドを形成するまでテストステロンを曝露し、CYP3A2 mRNA 発現量を評価したが、対照群と比較して変化は確認されなかった (data not shown)。ゆえに、*in vitro* 細胞培養系では発現量に性差がある CYP3A サブファミリーを性ホルモンだけで発現制御することは難しく、*in vivo* におけるホルモンの複雑なシグナル伝達が関与している可能性が示唆された。

亜鉛欠乏食により変動するのはテストステロンのみではなく、成長ホルモンも含まれていることから、成長ホルモンに着目して性差のある CYP3A サブファミリーの発現制御の検討も行われている。その中で、雄性ラットにおいて成長ホルモンを分泌する脳下垂体を除去すると CYP3A2, 3A18 mRNA 発現量は上昇するが、CYP3A9 mRNA 発現量は変化しないことや思春期前の雄性ラットに成長ホルモンを約 2 週間投与すると CYP3A2, 3A18 mRNA の発現量が低下することが明らかになっており (Kawai *et al.*, 2000)、成長ホルモンは雄に特異的な CYP3A2, 3A18 を抑制的に制御していることが示唆されている。また、ラットにおいて成長ホルモンの分泌パターンは雄では律動的であり、雌では持続的であることから (Waxman *et al.*, 1991)、雄性ラットにおいて成長ホルモンを 1 週間持続

的に投与したところ、ホルモンの分泌パターンが雌化され、CYP3A9 mRNA 発現量が上昇する一方で、CYP3A18 mRNA 発現量は減少することが明らかにされている (Robertson *et al.*, 1998)。ヒト初代肝細胞に関しては、成長ホルモンを持続的に曝露すると、女性で発現量が高いとされる CYP3A4 の mRNA, タンパク質発現量、酵素活性に変化は認められなかったものの、律動的に曝露するとこれら全てが有意に減少することから (Dhir *et al.*, 2005)、ラット、ヒトにおいて発現量に性差がある薬物代謝酵素は単純に成長ホルモンの分泌量ではなく、その分泌パターンにより生じるシグナル伝達を介して制御されている可能性が考えられる。したがって、本スフェロイド培養系においても、成長ホルモンを *in vivo* における分泌パターンと同様に曝露することで性差のある薬物代謝酵素の発現量を維持することが可能になるかもしれない。

本研究で用いている抗体 (Anti-CYP3A1 antibody: Merck Millipore) は CYP3A1/23 と CYP3A2 は識別できると記載されているが、CYP3A9, 3A18 までは言及されていない。過去の報告において CYP3A2 と CYP3A9 は C 末端のタンパク質の配列が似ていることから、抗体が交差反応する可能性が示唆されており (Aiba *et al.*, 2003)、本研究で示しているバンドが本当に CYP3A1/23 であることを示す必要がある。糖質コルチコイドであるデキサメタゾンはヒトやラットにおいて CYP3A の転写を促進することが知られているが、培養されたラット初代肝細胞においては他の CYP3A アイソザイムの転写は促進せず、CYP3A1/23 のみを促進することが報告されている (Hoen *et al.*, 2000)。そこで、本スフェロイド培養系においてもデキサメタゾンを曝露後、同じ CYP3A1/23 抗体を用いてバンドを確認したところ、同じ位置に強いバンドが確認された (data not shown)。ゆえに、スフェロイドにおける CYP3A サブファミリーの経時的な mRNA 発現量とこの結果を踏まえると、本研究で用いている抗体は CYP3A1/23 を正しく認識できていることが示された。

本章より、本スフェロイド培養系は CYP3A1/23 タンパク質を安定的に発現しており、化学物質がタンパク質分解系に及ぼす影響を評価する上で有用な培養系であることが示唆された。

### 第 3 章 アセトアミノフェンが CYP3A1/23 に及ぼす影響

#### 第 1 節 緒言

APAP は臨床において広く使用されている解熱鎮痛薬の一つであるが、過剰に服用すると肝障害を引き起こすことが知られており、その肝障害には代謝反応が寄与していることが明らかにされている (James *et al.*, 2003)。APAP は体内に取り込まれると、UGT や SULT により、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体となり、ほとんどが体外に排泄されるが、約 10 % が CYP の代謝を受けて *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) と呼ばれる反応性代謝物を生成する。NAPQI は生体内の還元型グルタチオン (GSH) により抱合反応を受けて、無毒のメルカプツール酸となり解毒されるが、過剰な服用により GSH が抱合できなくなるほど NAPQI の生成量が多くなると、様々な生体内高分子と結合し、活性酸素種 (ROS) の産生やタンパク質の機能障害を引き起こすことで毒性を示すことが報告されている (Dahlin *et al.*, 1984; James *et al.*, 2003)。

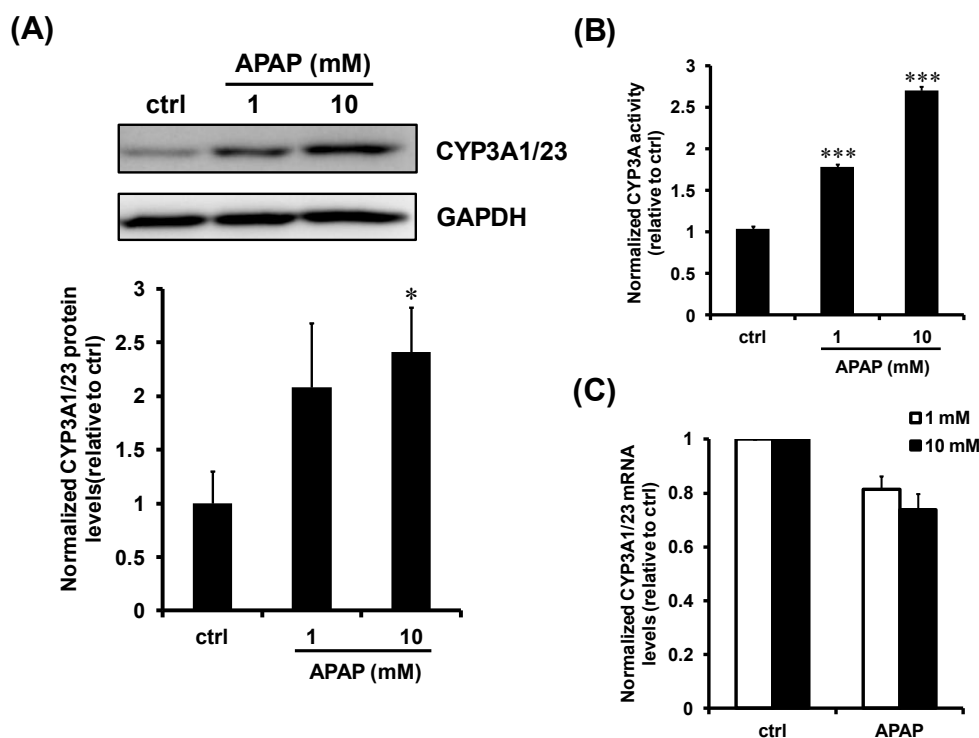
NAPQI の生成に関わる主要な薬物代謝酵素は CYP1A2, 2E1, 3A4 であり (Patten *et al.*, 1993; Thummel *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1998)、その寄与は阻害剤を用いた実験により、CYP2E1 が高いことが示唆されている (Hazai *et al.*, 2002)。しかし、ヒトのリコンビナント CYP を用いた実験では NAPQI の GSH 抱合体の生成量は CYP3A4 で最も高くなったことから (Laine *et al.*, 2009)、CYP3A も反応性代謝物を介した APAP 誘発性肝障害に関わる重要な代謝酵素であると言える。

序論でも記載したように、APAP はげっ歯類において CYP3A を誘導することが示唆されているものの、そのメカニズムに関する統合的な理解は未だに得られていない。そこで本章ではラット初代肝細胞スフェロイド培養系において APAP の CYP3A1/23 に及ぼす影響を精査することを目的とした。

## 第 2 節 APAP が CYP3A1/23 mRNA, タンパク質、CYP3A 酵素活性に及ぼす影響

過去の報告により、APAP (500 mg/kg) をラットに腹腔内投与したところ、CYP3A タンパク質発現量の上昇と CYP3A 酵素活性の上昇が確認されたことから (Kim *et al.*, 2007)、本スフェロイド培養系において APAP による CYP3A の酵素誘導を評価した。スフェロイドには CYP の代謝活性化による肝毒性が確認された 10 mM と毒性が確認されなかった 1 mM を 24 時間曝露した (Sanoh *et al.*, 2014)。APAP を曝露後、mRNA 抽出、タンパク質回収を行い、CYP3A 酵素活性は P450-Glo™ CYP3A4 assay を用いて発光の値から評価した。

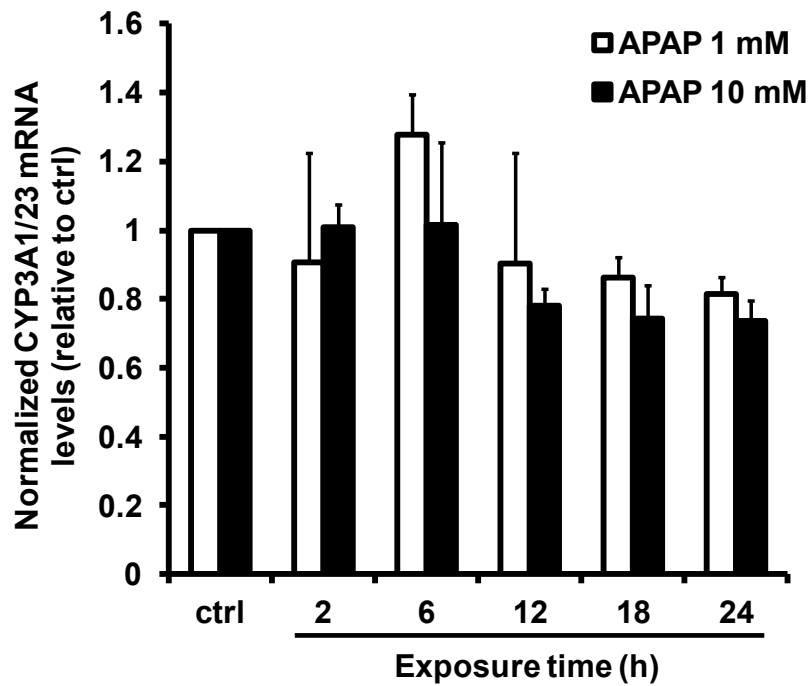
CYP3A1/23 タンパク質発現量は APAP (1, 10 mM) により上昇し、CYP3A 酵素活性も濃度依存的に上昇した。しかし、CYP3A1/23 mRNA 発現量の上昇は確認されなかった (Fig. 3-1)。曝露 24 時間以前に CYP3A1/23 mRNA 発現量が上昇している可能性があると考え、APAP による mRNA 発現量の経時的変化を評価したが、どの時間においても上昇は確認されなかった (Fig. 3-2)。



**Fig. 3-1 Effects of APAP on CYP3A1/23 protein levels and activity and mRNA levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (1 and 10 mM) for 24 h. (A) Representative results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \**P*



< 0.05 vs. ctrl, Tukey's test). (B) CYP3A metabolic activity was measured with luciferin-IPA. CYP3A metabolic activity was normalized to protein levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. ctrl, Tukey's test). (C) CYP3A1/23 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses. CYP3A1/23 mRNA levels were normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments).

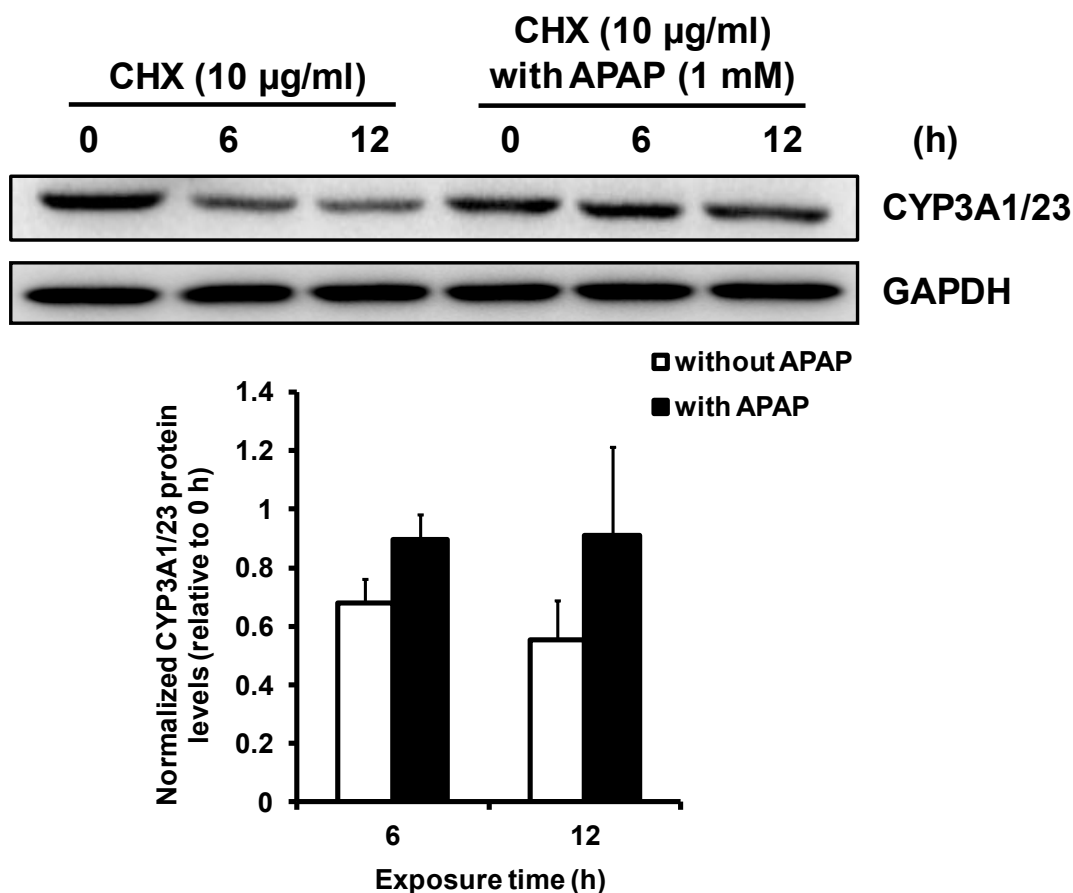


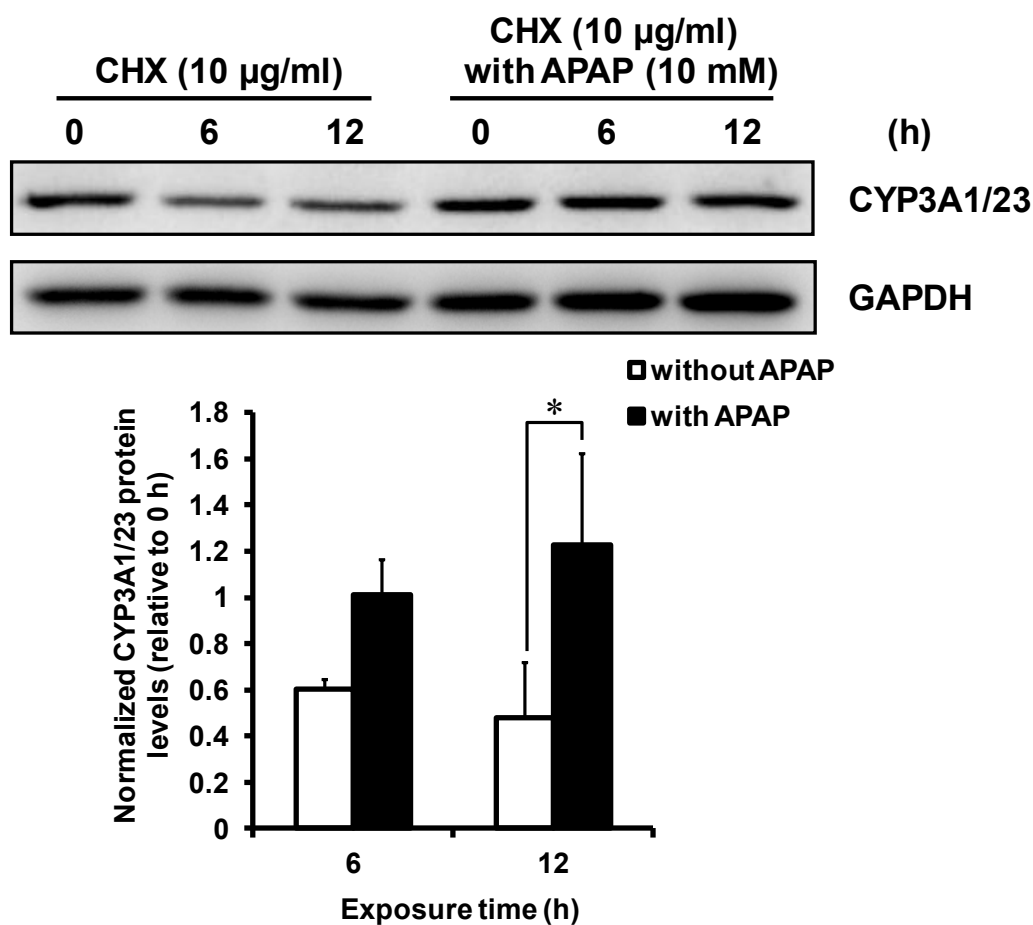
**Fig. 3-2 Effects of APAP on CYP3A1/23 mRNA levels over time.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (1 and 10 mM) for 2, 6, 12, 18 and 24 h before harvesting. CYP3A1/23 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses and normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments).

### 第 3 節 APAP が CYP3A1/23 タンパク質半減期に及ぼす影響

APAP による CYP3A1/23 タンパク質発現量の上昇が mRNA 発現量に依存していないことから、APAP は CYP3A1/23 タンパク質の分解を抑制することで酵素誘導を起こしていると仮説を立てた。そこで、タンパク質翻訳阻害剤である cycloheximide (CHX) をスフェロイドに曝露し、CYP3A1/23 タンパク質の半減期を評価するとともに、APAP を CHX と併用曝露し、CYP3A1/23 のターンオーバーに及ぼす影響を評価した。

CYP3A1/23 は本スフェロイド培養系において半減期はおよそ 11 h であり、APAP (10 mM) によりタンパク質半減期の延長が有意に確認されたことから APAP は CYP3A1/23 タンパク質の分解を抑制していることが明らかとなった (Fig. 3-3)。





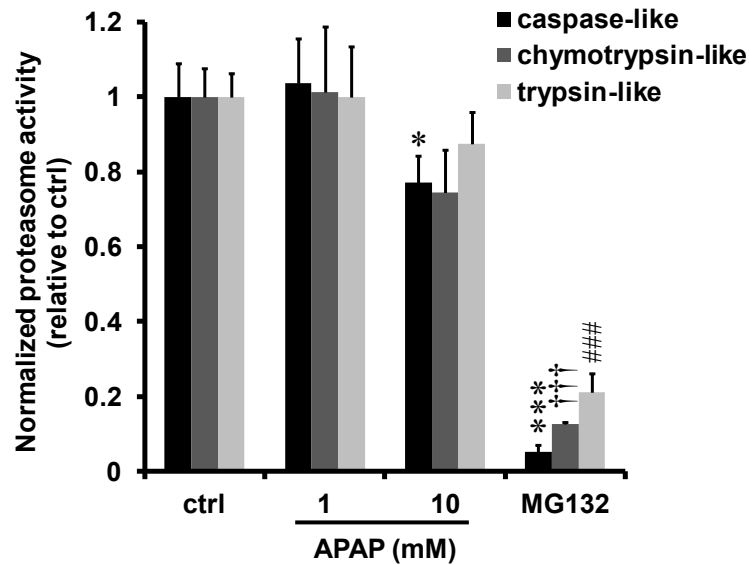
**Fig. 3-3 Effects of APAP on CYP3A1/23 protein degradation.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to cycloheximide (10 µg/ml) with or without APAP (1 and 10 mM) for 6 or 12 h before harvesting. Representative results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P < 0.05$  vs. without APAP, Tukey's test).

## 第 4 節 APAP がユビキチンプロテアソーム系に及ぼす影響

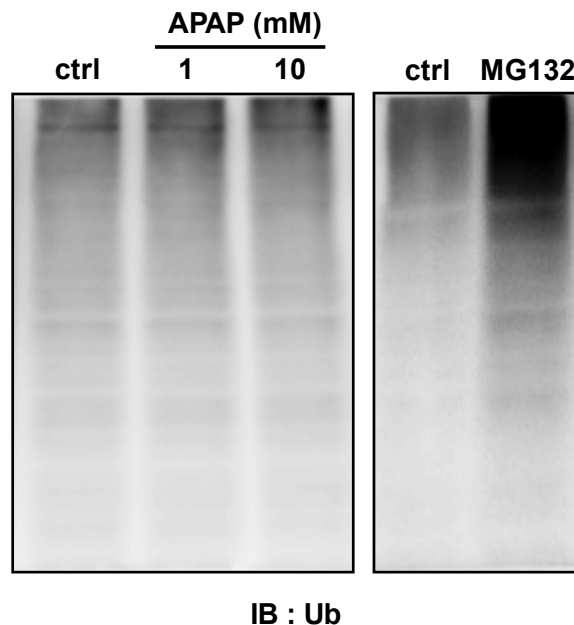
### 第 1 項 APAP がプロテアソーム活性に及ぼす影響

APAP が CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制を引き起こすことから、その分解系に及ぼす影響を評価した。CYP3A1/23 はユビキチンプロテアソーム系により分解されることから (Faouzi *et al.*, 2007)、まず APAP がプロテアソーム活性に及ぼす影響を評価した。プロテアソーム活性は 3 種類の蛍光基質を用いて、カスパーゼ様活性、キモトリプシン様活性、トリプシン様活性をそれぞれ測定した。ポジティブコントロールとして MG132 (10  $\mu$ M) を 6 時間曝露し、この評価系の妥当性を確認した。

APAP (1 mM) はプロテアソーム活性に影響を与えないものの、APAP (10 mM) はカスパーゼ様活性を有意に減少させた (Fig. 3-4)。しかし、MG132 と比較してその減少の度合いはわずかであることから、この減少が CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制に影響を与えているのかは分からない。そこでプロテアソーム活性の阻害の指標としてポリユビキチン化されたタンパク質の蓄積を評価した。その結果、MG132 により顕著にポリユビキチン化されたタンパク質の蓄積が確認されたものの、APAP (1, 10 mM) によりそのような影響は確認されなかった (Fig. 3-5)。ゆえに APAP (10 mM) による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制はプロテアソーム活性の減少に起因しないことが示唆された。



**Fig. 3-4 Effects of APAP on proteasome activity.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to either APAP (1 and 10 mM, 24 h) or MG132 (10 μM, 6 h) and harvested. Proteasome activities were measured with three proteasome substrates and normalized to protein contents. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P$  < 0.05, \*\*\* $P$  < 0.001, ††† $P$  < 0.001, ### $P$  < 0.001 vs. ctrl, Tukey's test).

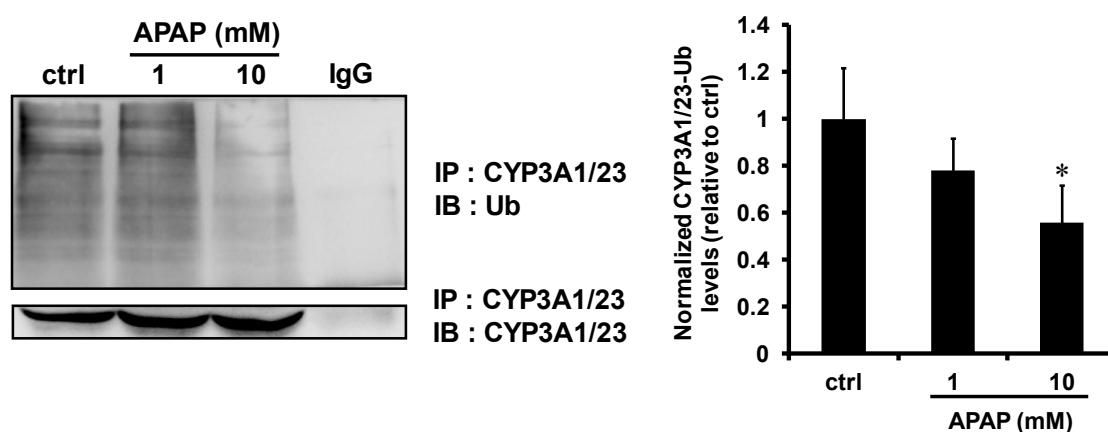


**Fig. 3-5 Effects of APAP on polyubiquitinated protein levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to either APAP (1 and 10 mM, 24 h) or MG132 (10 μM, 6 h) before harvesting. Results of ubiquitin immunoblotting analyses of cell lysates are shown. (n=1).

## 第 2 項 APAP が CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化に及ぼす影響

APAP はタンパク質の分解を担うプロテアソームに影響を及ぼさないことから、タンパク質を分解する際に必要なシグナルであるポリユビキチン鎖の形成が抑制されていると考え、APAP が CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化に及ぼす影響を評価した。

APAP は細胞内全体のユビキチンの量には影響を及ぼさないものの (Fig. 3-5)、CYP3A1/23 を免疫沈降した画分においては APAP の濃度依存的にそのユビキチン化は抑制されていた (Fig. 3-6)。ゆえに APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制はポリユビキチン化の阻害に起因することが示唆された。

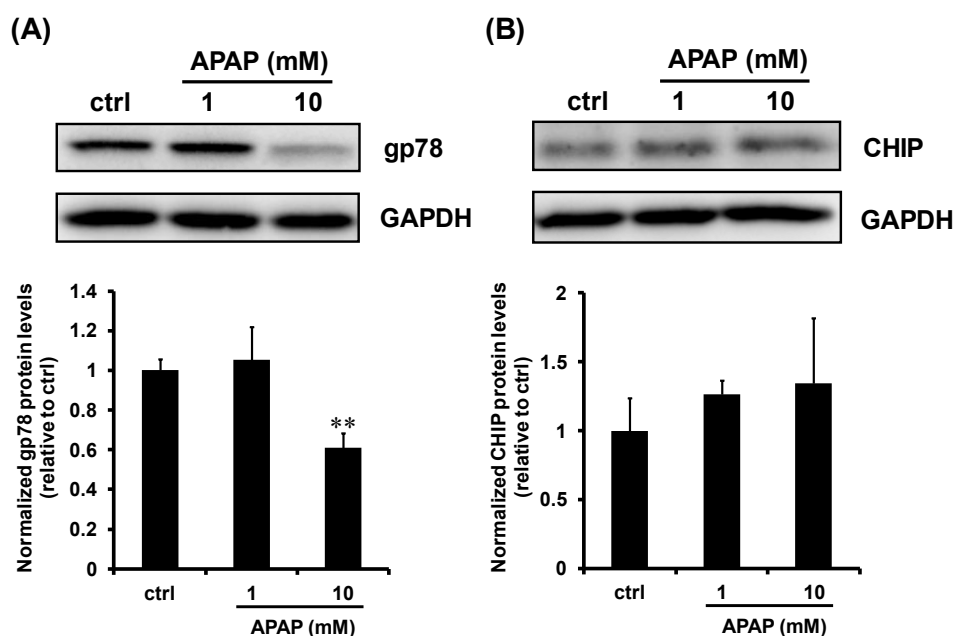


**Fig. 3-6 Effects of APAP on ubiquitination levels of CYP3A1/23 protein.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (1 and 10 mM, 24 h) with MG132 (10  $\mu$ M, 6 h) before harvesting. Representative results of ubiquitin and CYP3A1/23 immunoblotting analyses of CYP3A1/23 immunoprecipitates are shown in the left panel. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23-ubiquitin levels are shown in the right panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P$ < 0.05, vs. ctrl, Tukey's test).

### 第 3 項 APAP が CYP3A1/23 の E3 リガーゼに及ぼす影響

APAP が CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化を阻害していることから、CYP3A1/23 にユビキチンを付加するタンパク質 (E3 リガーゼ) に及ぼす影響を精査した。ラット初代肝細胞を用いた実験において生理学的条件下における CYP3A の E3 リガーゼは glycoprotein 78 (gp78) と C terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) であることが shRNA によるノックダウンの結果より明らかになっていることから (Kim *et al.*, 2010)、APAP が gp78, CHIP に及ぼす影響を評価した。

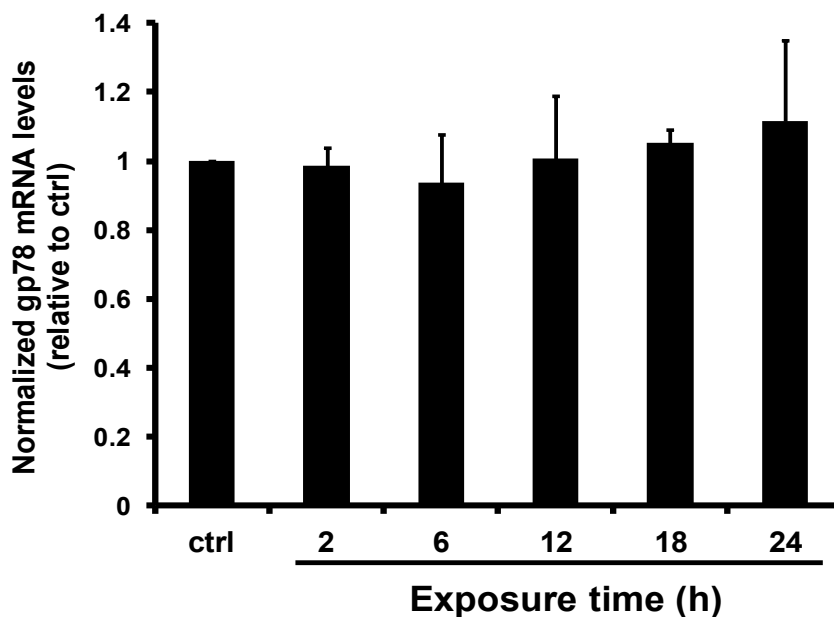
APAP は CHIP タンパク質発現量をほとんど変化させないものの、gp78 においては 10 mM において有意にタンパク質発現量を減少させていた (Fig. 3-7)。ゆえに APAP によるポリユビキチン化の阻害は CYP3A1/23 の E3 リガーゼである gp78 の発現量の低下に起因する可能性が示唆された。



**Fig. 3-7 Effects of APAP on gp78 and CHIP protein levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (1 and 10 mM) for 24 h before harvesting. (A) Representative results of gp78 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of gp78 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  independent experiments,  $**P < 0.01$  vs. ctrl, Tukey's test). (B) Representative results of CHIP and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. The results of densitometric quantification of CHIP protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. ( $n=3$  independent experiments).

#### 第 4 項 APAP が gp78 mRNA 発現量に及ぼす影響

前項で APAP (10 mM) が gp78 タンパク質発現量を減少させることを明らかにしたことから、その減少作用の要因を探るため、gp78 mRNA 発現量を経時的に評価した。しかし、どの時間においても APAP (10 mM) による mRNA 発現量の変化は認められなかった (Fig. 3-8)。



**Fig. 3-8 Effects of APAP on gp78 mRNA levels over time.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (10 mM) for 2, 6, 12, 18 and 24 h before harvesting. Gp78 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses and normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments).

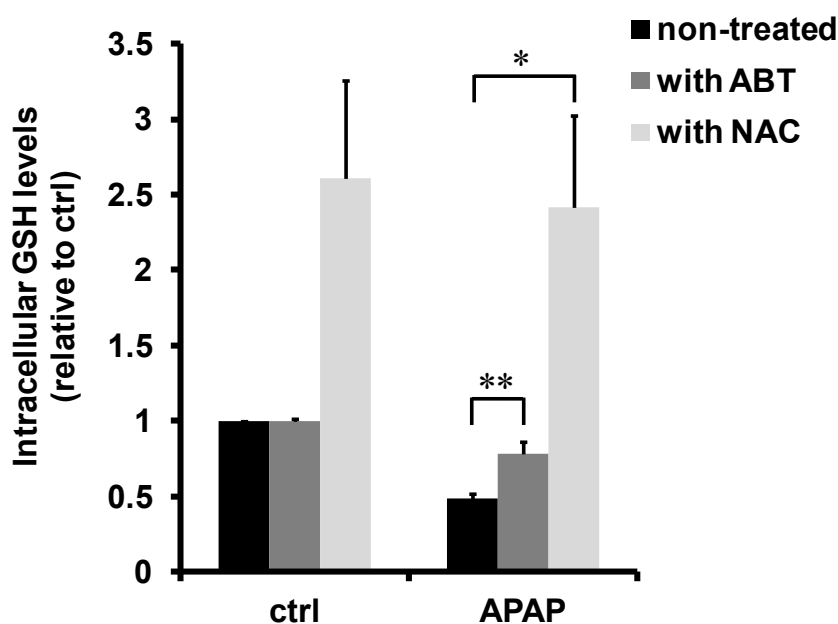


## 第 5 節 APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制における NAPQI, ROS の影響

### 第 1 項 APAP, ABT, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) 曝露後の細胞内 GSH の測定

APAP は CYP による代謝活性化を受けて反応性代謝物である NAPQI を形成し、細胞内の GSH を減少させ、ROS を産生する。この産生した ROS が CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制の引き金となっていると仮説を立てた。そこで本スフェロイド培養系において APAP により減少した GSH を非選択的 CYP 分子種阻害剤である ABT や GSH の前駆体である NAC がどの程度回復させるのかを評価した。細胞内 GSH 濃度は Glutathione Cell-Based Detection kit (Blue Fluorescence) を用いて測定した。

APAP (10 mM) により細胞内 GSH 濃度は約 50 % まで減少したが、ABT (500  $\mu$ M) との併用によりその減少は有意に抑制された。また、NAC (1 mM) との併用においても同様に GSH の減少は抑制された (Fig. 3-9)。ゆえに以下の実験では ABT (500  $\mu$ M) と NAC (1 mM) を用いて APAP が誘発する CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制に対する影響を評価した。

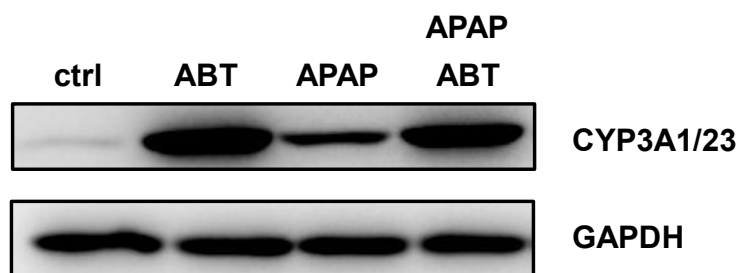


**Fig. 3-9 Effects of APAP, ABT, and NAC on intracellular GSH levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (10 mM), ABT (500  $\mu$ M) and NAC (1 mM) for 24 h before harvesting. In the case of NAC treatment, cells were pretreated with NAC (1 mM) for 30 min. Intracellular GSH levels were measured with Glutathione Cell-Based Detection kit (Blue Fluorescence). Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, vs. non-treated, t-test).

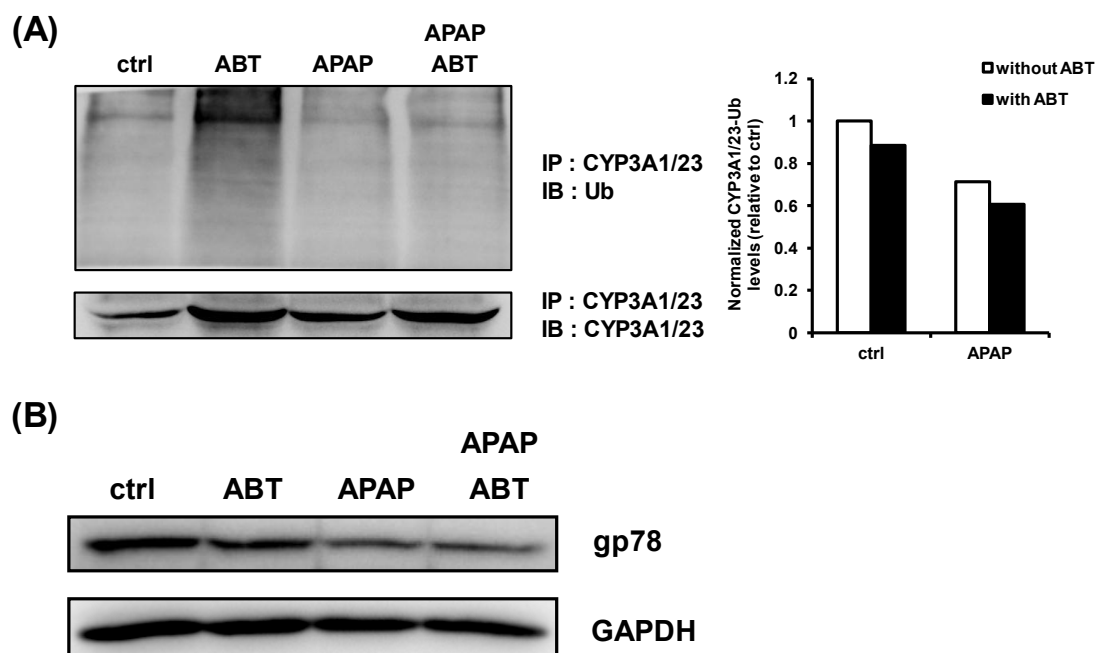
## 第 2 項 ABT が APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制に及ぼす影響

ABT が APAP による GSH 濃度の減少を抑制したことや NAPQI の GSH 抱合体である acetaminophen glutathione conjugate の生成量が ABT により有意に抑制されたことから (Sanoh *et al.*, 2014)、NAPQI の生成を ABT が抑制することが示された。そこで APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制における NAPQI の寄与を評価するため、ABT と APAP を併用曝露し、APAP の分解抑制作用における影響を評価した。

従来の報告通り、ABT は本スフェロイド培養系においても CYP3A1/23 タンパク質発現量を上昇させたことから (Fig. 3-10)、直接 CYP3A1/23 タンパク質に及ぼす影響を評価するのは難しいと考え、CYP3A1/23 のポリユビキチン化に対する ABT の影響を評価したが、APAP による CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化の阻害作用は ABT との併用において抑制されず、APAP により減少した gp78 の発現量も ABT との併用曝露により上昇させなかったことから (Fig. 3-11)、NAPQI が CYP3A1/23 の分解抑制に起因している可能性は低いことが示唆された。



**Fig. 3-10 Effects of APAP and ABT on CYP3A1/23 protein levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (10 mM), ABT (500  $\mu$ M) for 24 h before harvesting. Results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown. GAPDH was measured as a loading control. (n=1).

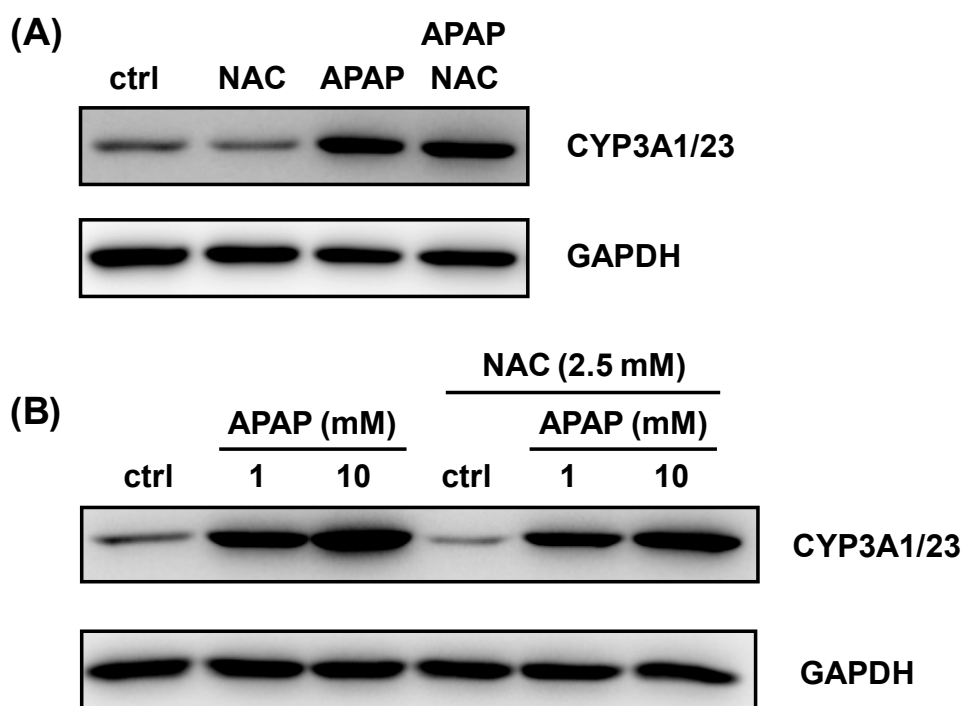


**Fig. 3-11 Effects of APAP and ABT on ubiquitination levels of CYP3A1/23 protein and gp78 protein levels.** (A) Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (10 mM, 24 h) and ABT (500  $\mu$ M, 24 h) with MG132 (10  $\mu$ M, 6 h) before harvesting. Results of ubiquitin and CYP3A1/23 immunoblotting analyses of CYP3A1/23 immunoprecipitates are shown in the left panel. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23-ubiquitin levels are shown in the right panel. (n=1). (B) Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (10 mM), ABT (500  $\mu$ M) for 24 h before harvesting. Results of gp78 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown. GAPDH was measured as a loading control. (n=1).

### 第 3 項 NAC が APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制に及ぼす影響

CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制が反応性代謝物である NAPQI に起因しない可能性が示唆されたことから、別のアプローチで分解抑制を引き起こしている原因を探れないかと考えた。NAPQI ではなく、APAP 自身によって ROS が産生されている可能性を考え、細胞内の ROS を軽減することが知られる NAC との併用曝露における影響を評価した。

細胞内 GSH の上昇が確認された NAC (1 mM) を APAP (10 mM) と併用曝露しても CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制作用は軽減されなかった。濃度を上げて NAC (2.5 mM) と APAP (1, 10 mM) を併用曝露しても同様に軽減されなかったことから、ROS が CYP3A1/23 の分解抑制を引き起こしている可能性は低いことが示唆された (Fig. 3-12)。



**Fig. 3-12 Effects of APAP and NAC on CYP3A1/23 protein levels.** (A) Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (10 mM) and NAC (1 mM) for 24 h before harvesting. Cells were pretreated with NAC (1 mM) for 30 min. Results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown. (n=1). (B) Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to APAP (1 and 10 mM) and NAC (2.5 mM) for 24 h before harvesting. Cells were pretreated with NAC (2.5 mM) for 30 min. Results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown. (n=1).

## 第 6 節 小括

転写の活性化や抑制ではなく CYP3A タンパク質自身に作用する化学物質としては、血圧降下剤であるジヒドロピリジン系  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遮断薬（例：ニフェジピン）の構造類縁体である 3,5-Dicarboethoxy-2,6-dimethyl-4-ethyl-1,4-dihydropyridine (DDEP) が CYP の活性中心であるヘムに作用することで急速に分解することやマクロライド系抗生物質である triacetyloleandomycin (TAO) が CYP3A タンパク質の分解を抑制するものの、mechanism-based inhibition (MBI) を起こし、酵素活性を阻害することが報告されている (Watkins *et al.*, 1986; Correia *et al.*, 1987; Faouzi *et al.*, 2007)。Faouzi らは TAO により CYP3A タンパク質のポリユビキチン化が阻害されていることから、その分解抑制作用は CYP3A と TAO が複合体を形成することで構造の変化が生じ、ユビキチン化されるリジン残基が E3 リガーゼに認識されにくくなることに起因すると考察している。DDEP による CYP3A の分解の促進に関しても、ヘムに作用することで CYP3A タンパク質の構造に変化が起こり、ユビキチン化が促進され、分解されることが示唆されていることから、化学物質が CYP3A タンパク質の分解を促進、抑制する作用において、CYP そのものに化学物質が影響を及ぼすことが引き金となる可能性が高いことが分かる。本研究でも TAO による MBI と同様に APAP の反応性代謝物である NAPQI が CYP3A タンパク質と不可逆的に結合して分解抑制を起こしている可能性を考えたが、ABT により NAPQI の生成を阻害しても APAP による CYP3A タンパク質のポリユビキチン化の阻害が抑制されなかったことやマウスに APAP を投与後 APAP と結合する肝臓中のタンパク質を網羅的に解析した結果、CYP との結合は報告されていないことから (Qiu *et al.*, 1998)、APAP は MBI とは異なる形式により、分解抑制を引き起こしていることが示唆された。

CYP3A タンパク質は小胞体に存在するタンパク質であり、endoplasmic reticulum related degradation (ERAD) により分解される (Correia *et al.*, 2003)。その分解経路は (1) : protein kinase A or C (PKA, PKC) により CYP3A の特定のセリン、スレオニン残基がリン酸化されること (2) : そのリン酸化状態を E2/E3 複合体が認識し、CYP3A がユビキチン化されること (3) : 小胞体に局在しているユビキチン化された CYP3A がプロテアソームへ輸送されることを必要とする (Wang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Acharya *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012)。ゆえに APAP による CYP3A タンパク質のポリユビキチン化の阻害に関して、E3 リガーゼである gp78 タンパク質発現量の低下の他にも CYP3A の PKA, PKC によるリン酸化の阻害も関与している可能性が考えられる。しかし、マウス初代肝細胞に APAP (5 ~ 15 mM) を曝露したところ PKC の活性化が起きていることから (Saber *et al.*, 2014)、APAP が作用しているメインターゲットは PKA, PKC ではなく、E3 リガーゼである可能性が高いと推測される。しかし、APAP (1 mM) においては gp78 タンパク質発現量は変化しないにもかかわらず、CYP3A タンパク質の緩やかな分解

抑制やポリユビキチン化の阻害が確認された。これは APAP が gp78 タンパク質に直接作用し、発現量は変化させないが E3 リガーゼ活性は減少させている可能性に起因すると考えられる。あるいは、gp78 は RING フィンガードメインを有しており、自己をユビキチン化してプロテアソーム系により分解される (Fang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006) ことや APAP (10 mM) において gp78 タンパク質発現量は減少するものの、その mRNA 発現量は減少していなかったことを踏まえると、APAP により活性化されたシグナルが gp78 の自己ユビキチン化を亢進し、本来 gp78 によりユビキチン化されるはずだったタンパク質のユビキチン化が競合的に阻害され、濃度依存的に gp78 のタンパク質分解につながり、結果的にタンパク質発現量が低下している可能性も考えられる。

一方で、CYP3A において E3 リガーゼとして働く CHIP タンパク質の発現量の変化は APAP により認められなかった。In vitro の実験において gp78 はユビキチン化された Glutathione S-transferase (GST) のポリユビキチン化を担うものの、ユビキチン化されていない GST のポリユビキチン化は行わないという報告があることや (Morito *et al.*, 2008)、CYP3A タンパク質において CHIP は最初のユビキチン化を行い、gp78 はポリユビキチン化を行っているという考察もあることから (Kim *et al.*, 2016)、APAP はユビキチンプロテアソーム系による分解において重要であるポリユビキチンシグナルを gp78 タンパク質の減少を介して阻害することで分解を抑制することが示唆された。

Gp78 は小胞体膜貫通型のタンパク質であり、ERAD において重要な役割を担う (Christianson and Ye, 2014)。これまでの報告で、gp78 によるユビキチン化は核近傍の小胞体ではなく、核から離れたミトコンドリア付近に存在する滑面小胞体において行われ、その小胞体間の局在は gp78 の特定のセリン残基のリン酸化により制御されることが明らかにされている (St-Pierre *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015)。Li らは gp78 のセリン残基のアスパラギン酸置換による疑似リン酸化が滑面小胞体に存在する gp78 の発現量を減少させることや gp78 によりユビキチン化されるミトコンドリアタンパク質である mitofusin 1 (MFN1) の分解が同様の疑似リン酸化により抑制されること、また 無血清培地で培養することで p38 MAP kinase を活性化すると MFN1 の分解が抑制され、p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 を曝露すると、その分解抑制作用が緩和されることを報告している。そこで、無血清培地で培養した際の CYP3A の mRNA、タンパク質発現量ならびに酵素活性を評価したところ、mRNA 発現量の上昇よりも高くタンパク質発現量が上昇し、酵素活性もそれに伴い上昇していた (data not shown)。ヒト初代肝細胞において APAP は p38 MAP kinase を活性化する報告があることから (Mobasher *et al.*, 2013)、p38 MAP kinase を活性化するような化学物質は CYP3A の分解抑制を起こす可能性がある。

本章より、APAP は転写活性化ではなく E3 リガーゼの発現量の減少に基づくタンパク質の分解抑制により CYP3A 酵素活性を上昇させることが示唆された。

## 第 4 章 アセトアミノフェン構造類縁体が CYP3A1/23 に及ぼす影響

### 第 1 節 緒言

APAP が肝毒性を引き起こすメカニズムは多数報告されており、その中には APAP と APAP 構造類縁体の毒性の比較も存在する。APAP の位置異性体である *N*-acetyl-*m*-aminophenol (AMAP) は APAP と同様に解熱鎮痛作用を有しているが、マウスにおいて APAP と比較して肝毒性を示さないこと、そしてこの肝毒性プロファイルの違いは反応性代謝物のミトコンドリアタンパク質への結合量の違いに起因していることが報告されている (Xie *et al.*, 2015)。また、*N*-acetyl-*o*-aminophenol (AOAP) も肝臓中のタンパク質へ結合するものの、ハムスターにおいて APAP よりも毒性が低いことが報告されている (Hamilton and Kissinger, 1986; Rottero and Kissinger, 1987)。

一方で、ラット、ヒト肝臓スライスにおいて AMAP は APAP と同様に肝毒性を示すことや、ヒト初代肝細胞において APAP と同様にミトコンドリアタンパク質へ結合し、同程度の肝毒性を示すことが近年明らかにされている (Hadi *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015)。AMAP は NAPQI のようなキノンイミンは形成しないものの、上記のようにミトコンドリアタンパク質と結合していることから、キノンイミンとは異なる反応性代謝物を生成し、それが CYP3A タンパク質に影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。

そこで本章では APAP 構造類縁体 (Fig. 4-1) を用いて CYP3A1/23 に及ぼす影響を比較した。評価化合物として AMAP, AOAP 以外にも APAP の水酸基がカルボキシ基に置換された *p*-acetamidobenzoic acid (PAcBA) を選択し、CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制メカニズムについて更なる探索を行った。

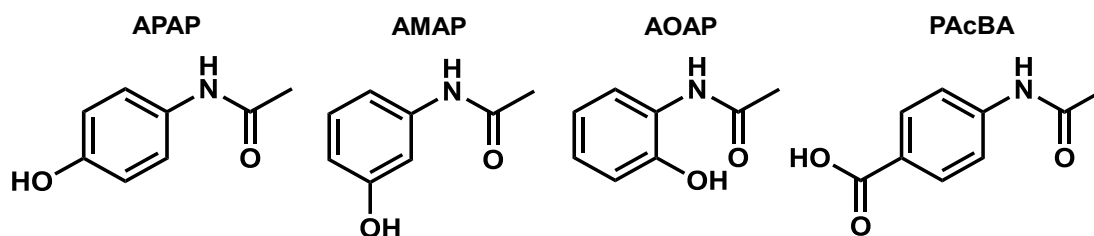
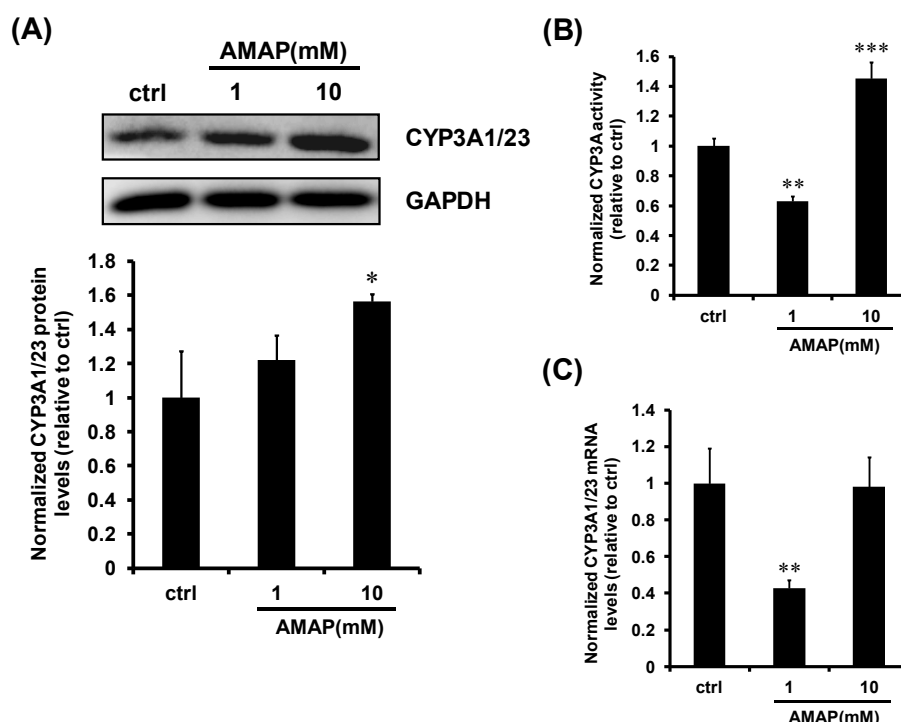


Fig. 4-1 Chemical structures of APAP analogs

## 第 2 節 AMAP が CYP3A1/23 に及ぼす影響

APAP と同様に CYP3A1/23 タンパク質発現量、酵素活性、mRNA 発現量を評価した。その結果、タンパク質発現量は 10 mM において有意に上昇した。一方、酵素活性は 1 mM において有意な減少が認められ、10 mM においては逆に有意な上昇が確認された。mRNA 発現量は酵素活性の低下が認められた 1 mM において有意な減少が認められたものの、タンパク質発現量、酵素活性の上昇が確認された 10 mM において変化は認められなかった (Fig. 4-2)。

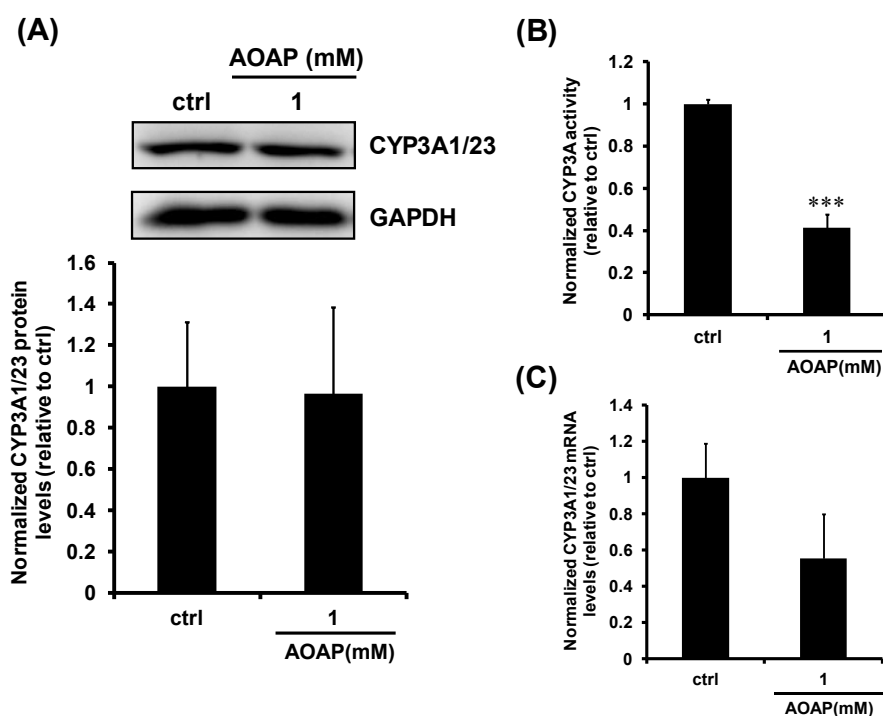


**Fig. 4-2 Effects of AMAP on CYP3A1/23 protein levels and activity and mRNA levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to AMAP (1 and 10 mM) for 24 h. (A) Representative results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P$  < 0.05 vs. ctrl, Tukey's test). (B) CYP3A metabolic activity was measured with luciferin-IPA. CYP3A metabolic activity was normalized to protein levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. ctrl, Tukey's test). (C) CYP3A1/23 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses. CYP3A1/23 mRNA levels were normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments \*\* $P$  < 0.01 vs. ctrl, Tukey's test).



### 第 3 節 AOAP が CYP3A1/23 に及ぼす影響

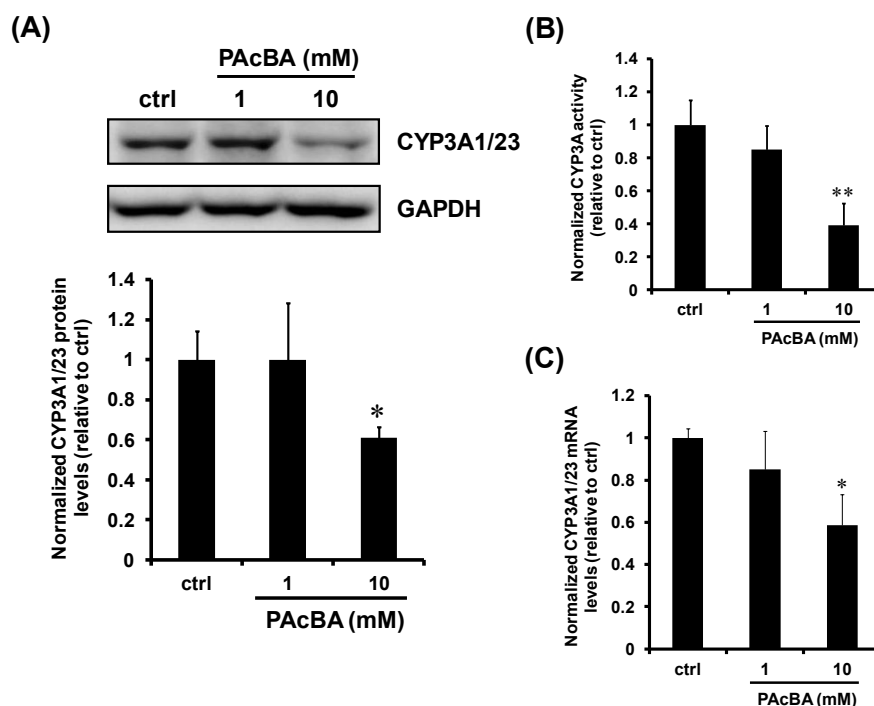
AOAP は 10 mM において培養メディアウムに溶解しなかったため、1 mM のみで検討を行った。その結果、タンパク質発現量には変化は認められなかったものの、酵素活性、mRNA 発現量において減少が確認された (Fig. 4-3)。



**Fig. 4-3 Effects of AOAP on CYP3A1/23 protein levels and activity and mRNA levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to AOAP (1 mM) for 24 h. (A) Representative results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments). (B) CYP3A metabolic activity was measured with luciferin-IPA. CYP3A metabolic activity was normalized to protein levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. ctrl, t-test). (C) CYP3A1/23 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses. CYP3A1/23 mRNA levels were normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments).

#### 第 4 節 PAcBA が CYP3A1/23 に及ぼす影響

PAcBA は直接培養メディウムには溶解しなかったため、カルボン酸の部分をナトリウム塩化し、メディウムへ溶解させ、検討を行った。その結果、10 mM においてタンパク質発現量、酵素活性、mRNA 発現量において有意な減少が確認された (Fig. 4-4)。



**Fig. 4-4 Effects of PAcBA on CYP3A1/23 protein levels and activity and mRNA levels.** Rat hepatocyte spheroids (day 5) were exposed to PAcBA (1 and 10 mM) for 24 h. (A) Representative results of CYP3A1/23 and GAPDH immunoblotting analyses of cell lysates are shown in the top panel. GAPDH was measured as a loading control. The results of densitometric quantification of CYP3A1/23 protein levels are shown in the bottom panel. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P$  < 0.05 vs. ctrl, Tukey's test). (B) CYP3A metabolic activity was measured with luciferin-IPA. CYP3A metabolic activity was normalized to protein levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \*\* $P$  < 0.01 vs. ctrl, Tukey's test). (C) CYP3A1/23 mRNA levels were measured by qRT-PCR analyses. CYP3A1/23 mRNA levels were normalized to  $\beta$ -2-m mRNA levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=3 independent experiments, \* $P$  < 0.05 vs. ctrl, Tukey's test).

## 第 5 節 小括

APAP の構造類縁体である AOAP, AMAP (1 mM) により mRNA 発現量の減少が確認されたものの、APAP (1 mM) において mRNA 発現量の顕著な減少は認められなかったことから、構造ではなく、AOAP, AMAP に共通する代謝物が mRNA 発現量の減少を引き起こしていると推測される。AOAP, AMAP はマウス肝ミクロソームとインキュベーションすると両方とも 2-acetamidohydroquinone (2-AcHQ) を生成することが報告されており (Hamilton and Kissinger, 1986)、この 2-AcHQ はさらに酸化代謝を受けて、2-acetamido-*p*-benzoquinone (APBQ) を生成することが明らかにされている (Streeter *et al.*, 1984; Streeter and Baillie, 1985)。APBQ は反応性が高いベンゾキノンであることから、細胞内タンパク質へと結合し、何かしらのカスケードを経て、mRNA 発現量を減少させている可能性があるが、これまでに AOAP, AMAP が CYP3A mRNA 発現量に及ぼす影響を評価した報告はないため、転写の上流にあるメカニズムに関しては更なる検討が必要である。

AOAP, AMAP (1 mM) によりタンパク質発現量の変化は確認されなかったが、酵素活性の有意な減少が認められた。この原因としては上記で触れた両方の共通代謝物である APBQ の関与が疑われる。これまでの報告において、精製したヒト CYP2E1 と AMAP をプレインキュベーションし、CYP2E1 の基質である chlorzoxazone を用いて酵素活性を評価したところ、AMAP の濃度、時間依存的に CYP2E1 酵素活性の減少が確認されている。また、その酵素活性阻害作用は NADPH を添加すると増強し、GSH を添加すると減弱したことから、AMAP 自身ではなく、AMAP の代謝物に起因すること、さらにその代謝物は LC/ESI-MS を用いた解析から APBQ である可能性が示唆されている (Harrelson *et al.*, 2012)。また、マウス *in vivo* において、AMAP は APAP と比較してミトコンドリアタンパク質ではなく、小胞体や細胞質タンパク質へ結合しやすいことが報告されていることから (Qiu *et al.*, 2001)、CYP3A タンパク質においても同様に APBQ が結合し、酵素活性を減少させていると考えられる。一方で、AMAP (10 mM) により CYP3A タンパク質発現量、酵素活性は有意に上昇していることが確認された。この二相性に関しては現段階で考察することは難しいが、10 mM では未変化体濃度がかなり高いこと、マウス *in vivo* において APBQ の生成量は AMAP の 10 % 以下であることから (Rashed *et al.*, 1990)、1 mM と比較して相対的に AMAP 自身の影響を強く受けている可能性がある。

AOAP, AMAP (1, 10 mM) において mRNA 発現量と比較して高いタンパク質発現量を示していたことから、APAP と同様にタンパク質の分解抑制作用を有していると考えられる。一方で、水酸基がカルボキシ基に置換された PAcBA では mRNA 発現量の減少に伴いタンパク質発現量も減少していた。これらの違いはその化学構造におけるフェノール性

水酸基の有無であることから、さらに化合物を増やし、化学構造の違いを考慮に入れながら検討を行うことでタンパク質分解抑制作用の詳細なメカニズムの解明につながる可能性がある。

本章より、APAP に加えてその構造類縁体である AMAP も CYP3A タンパク質の分解抑制により酵素活性の上昇を引き起こす可能性があることが示唆された。

## 第 5 章 考察および総括

薬物代謝酵素は医薬品や有害物質などの生体異物や内在性物質の代謝、排泄を担う重要な酵素である。2006 ～ 2015 年にかけて FDA に承認された低分子医薬品の薬物代謝を受ける割合において CYP ファミリーは約 50 % を占めることから (Cerny, 2016)、医薬品の化学構造が多様化され、CYP 以外の様々な代謝酵素の寄与が高まっている現在でも薬物間相互作用を考慮する上で注意が必要とされている。

CYP3A サブファミリーは化学物質による酵素誘導下において mRNA 発現量と酵素活性に良好な相関を有することは序論でも述べたが、様々なドナー由来のヒト肝ミクロソームにおいても、mRNA 発現量と酵素活性は良好な相関を示すことが報告されている (Ohtsuki *et al.*, 2011)。同論文では 3A 以外の CYP サブファミリーに関しても評価しており、その相関係数は分子種間で異なることも明らかにされている。例えば、CYP3A4 における相関係数は約 0.9 であるのに対して、CYP2C9, 2E1 における相関係数は 0.5 未満であり、この二つのサブファミリーにおける mRNA 発現量とタンパク質発現量の相関係数は 0.1 前後であった。ゆえに CYP2C9, 2E1 は化学物質曝露下の酵素活性の変動において mRNA 発現量を指標とすることが難しく、転写後調節や翻訳後調節による寄与の方が大きいと推測される。CYP2E1 に関する報告では 25 人のドナー由来のヒト肝ミクロソームにおける miR-378 発現量が CYP2E1 タンパク質発現量、酵素活性との間に有意な逆相関を示すことや、miR-378 を過剰発現させると CYP2E1 タンパク質発現量、酵素活性は減少することが示唆されており (Mohri *et al.*, 2010)、miRNA の発現量に影響を及ぼす化学物質は mRNA 発現量に依存することなく、酵素活性を上昇もしくは阻害する可能性がある。

mRNA 発現量とタンパク質発現量の相関係数は分子種間で異なるため、翻訳制御機構が異なると推測されるが、タンパク質半減期やその分解経路も異なることが明らかにされている。例えば、ラット肝臓中に発現している CYP の生理学的条件下における半減期は CYP2B1, 2C11 が 20 時間以上であるのに対して、CYP3A1/23 は 10 時間前後であることや CYP2E1 は 7 時間前後で急速に分解された後、38 時間前後で緩やかに分解されるといった二相性の半減期を示すことが知られている。また、半減期の長い CYP2B1, 2C11 はオートファジー系により分解されることが示唆されている (Correia *et al.*, 2003)。近年では、ヒト肝臓中に発現している CYP タンパク質のターンオーバーに関する研究も進んでおり、CYP3A4 はラットと同様の半減期、分解経路を示すことや、CYP2E1 はユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系の両方で分解されることが明らかにされている。一方で、CYP2B6, 2C9 の半減期は 6, 12 時間前後であり、CYP2B6 はユビキチンプロテ

アソーム系で、CYP2C9 は CYP2E1 と同様にユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系の両方で分解されることから、同じサブファミリーでもラットと異なることが示唆されている (Kim *et al.*, 2016)。

このように分子種間で半減期が異なる原因の一つとして ROS の関与が疑われる。これまでに CYP ファミリーは基質存在下および非存在下において ROS を産生すること、CYP に電子を供給するタンパク質である cytochrome P450 reductase を不活性化するとラット CYP2E1 タンパク質発現量が上昇することが明らかにされている (Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1999; Zangar *et al.*, 2004)。CYP への電子の供給が止まり、ROS の産生が抑制されたことがタンパク質発現量の上昇につながると考えると、生理学的条件下における ROS の産生量が多い分子種ほどタンパク質が損傷を受けて、ユビキチンプロテアソーム系により速やかに分解されることが半減期の違いを生み出していると推測される。

タンパク質の分解に関連した CYP タンパク質の発現量の変動にはユビキチンプロテアソーム系やオートファジー系に関与するタンパク質に加えて、タンパク質の安定化に関わる分子シャペロンの関与もこれまでに示唆されている。例えば、分子シャペロンである Hsp40 と CYP3A4 を大腸菌に過剰発現させると、CYP3A4 単独で発現させた場合と比較してタンパク質発現量、酵素活性が上昇することや、ラット CYP2E1 は hsp90 の阻害剤である radicicol により濃度依存的にタンパク質発現量、酵素活性が減少することが明らかにされている (Ahn and Yun, 2004; Morishima *et al.*, 2005)。また、化学シャペロンである dimethyl sulfoxide は 0.1 % (14 mM) においてラット CYP3A を安定化し、mRNA 発現量に依存することなく、酵素活性を上昇させることから (Zangar and Novak, 1998)、タンパク質の正しいフォールディングを促進することでタンパク質発現量、酵素活性を上昇させる可能性が示唆されている。パーキンソン病やアルツハイマー病は  $\alpha$  シヌクレインタンパク質や  $\beta$  アミロイドタンパク質などがミスフォールドし、凝集することが原因であると考えられており、その治療薬の一つとして化学シャペロンが期待されている。ゆえに、化学シャペロン活性に着目した医薬品候補化合物は CYP3A 酵素活性を上昇させ、体内動態を考慮する上で注意を要する可能性がある。

酵素タンパク質における活性制御機構としてアロステリック効果やフィードバック効果などがあるが、CYP ファミリーにおいても化学物質によりアロステリック調節を受けることが示唆されている。CYP3A4 は代謝反応において一般的なミカエリスメンテン式とは異なる不規則な酵素反応速度式を示す場合があり、その不規則性は代謝反応がその基質濃度に伴い活性化する「ホモトロピック効果」、ある基質の代謝反応が別の化合物によって活性化される「ヘテロトロピック効果」に分けられる。CYP1A2 の阻害剤として知られる ANF はヘテロトロピック効果により CYP3A4 の基質の代謝を活性化させることが明らかにされている。そのメカニズムとして CYP3A4 は活性化状態と不活性化状態同士がオリゴマ

ーを形成しており、そのオリゴマーにエフェクター因子として ANF が結合することで活性化状態から活性化状態へ変化し、基質の代謝が促進されることが示唆されている (Davydov *et al.*, 2013)。これは化学物質が mRNA, タンパク質発現量に依存することなく酵素活性を変動させる報告であり、薬物間相互作用の観点から注意が必要になる事例だと言える。

APAP によるタンパク質の分解抑制を介した酵素活性の上昇は異物応答の一つだと考えると、APAP を代謝する CYP1A2, 2E1 においても同様に酵素活性の上昇を引き起こしている可能性がある。生理学的条件下においてヒト CYP2E1 の E3 リガーゼは CYP3A4 と同様に gp78, CHIP であることから (Wang *et al.*, 2011)、分解抑制を介した酵素活性の上昇が起きていると推測されるものの、生理学的条件下と基質存在下では CYP2E1 タンパク質の分解メカニズムが異なることから一概には断定できない。CYP2E1 はエタノールやアセトンの代謝を行い、かつこれらの化合物により酵素誘導されることが知られており、そのメカニズムとしてタンパク質の安定化の寄与が示唆されている (Gonzalez, 2007)。同論文ではその根拠として、生理学的条件下の CYP2E1 の半減期にはタンパク質が急速に分解される “rapid phase” と緩やかに分解される “slow phase” があるが、エタノールやアセトンにより “rapid phase” が失われ、“slow phase” のみで分解されることが確認された報告を挙げている (Song *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1995)。また、ラット肝ミクロソームにおいて CYP2E1 の全長を認識する抗体では酵素活性を減少させないものの、ユビキチン化される特定のリジン残基を認識する抗体は酵素活性を減少させたことから、ユビキチン化される部位と基質結合部位は重なっていることが示唆されている (Banerjee *et al.*, 2000)。ゆえに、エタノール、アセトンによる CYP2E1 タンパク質の安定化は基質が結合することでユビキチン化されにくくなり、分解が抑制されたことに起因する可能性がある。さらに、アセトン存在下におけるラット CYP2E1 タンパク質の分解経路にはオートファジー系の関与が示唆されていることから (Ronis *et al.*, 1991)、CYP2E1 タンパク質は基質によりユビキチン化されなくなると、オートファジー系にスイッチし、分解されると推測される。APAP (10 mM) はマウス初代肝細胞においてオートファジーを誘導するため (Ni *et al.*, 2012)、APAP により gp78 タンパク質発現量が低下し、CYP3A タンパク質と同様に CYP2E1 タンパク質は分解抑制を受けるものの、ユビキチンプロテアソーム系からオートファジー系へとスイッチが起こり、誘導されたオートファジー系により分解される可能性がある。

CYP1A2 タンパク質に関してはラット初代肝細胞においてプロテアソーム阻害剤である Lactacystin により CYP1A2 タンパク質発現が上昇したことから、その分解にはユビキチンプロテアソーム系が関与していること、そしてタンパク質半減期は 10 時間前後であることが報告されている (Roberts, 1997)。しかし、その詳細な分解メカニズムは明らかにされておらず、APAP が CYP1A2 に及ぼす影響については更なる研究が必要となる。

APAP は CYP2E1 により代謝活性化を受けて肝毒性を示すことが示唆されているが、マウス *in vivo* において CYP3A の誘導剤である rifampicin と APAP を併用すると、APAP 単独と比較して毒性が増強したことから (Cheng *et al.*, 2009)、CYP3A も肝毒性に寄与していると考えられる。また、APAP (500 mg/kg) と vehicle control を投与したラットに 18 時間後に APAP (500 mg/kg) を投与すると、APAP の血中濃度時間曲線下面積には変化が認められないにも関わらず、事前に APAP を投与したラットにおいて毒性が強く発現していること、さらに NAPQI の GSH の抱合から最終的に生成される APAP-Cysteine の生成量が上昇していることから、APAP は CYP を活性化させ、毒性を増強していることが示唆されている (Kim *et al.*, 2009)。ゆえに、本研究で示した APAP による CYP3A タンパク質の分解抑制を介した酵素活性の上昇は肝毒性の増強に起因しているかもしれない。

CYP3A4 は肝臓の他にも小腸において高い発現を示しており、経口投与した医薬品の初回通過の代謝に大きく関与している。ゼブラフィッシュにおいて gp78 は腸にも発現が確認されていることから (Chen *et al.*, 2014)、仮に小腸の CYP3A4 タンパク質も肝臓の CYP3A4 と同様の分解メカニズムを有するのであれば、APAP により小腸 CYP3A4 タンパク質の分解も抑制され、酵素活性が上昇すると推測される。小腸は経口投与された医薬品の曝露濃度が肝臓よりも高いと考えられることから、APAP は肝臓よりも先に小腸の CYP3A4 タンパク質の発現量を分解抑制作用により上昇させ、CYP3A4 で代謝される医薬品の吸収過程の薬物間相互作用を引き起こす可能性がある。

本研究により、APAP が転写活性化による酵素誘導ではなく、タンパク質の分解を抑制することで CYP3A 酵素活性を上昇させるメカニズムを初めて明らかにしたが、現状では同様の作用を有する化学物質として位置異性体である AMAP しか明らかになっていない。また、高い濃度域でのみ起きる現象であることから、臨床用量における薬物間相互作用は確認されないと考えられる。しかし、化学構造に基づく同様の作用を有する化学物質の探索や gp78 タンパク質の減少を引き起こすメカニズムの解明により分解抑制を引き起こす要因が明らかにされれば、酵素誘導の新しい概念として注意が必要となり、薬物間相互作用を考慮した創薬を行う上で重要な知見となり得る。また、これまでにタンパク質の分解経路が明らかにされているのは CYP のみであり、抱合代謝に関わる UGT, SULT や医薬品代謝において近年重要視されている Aldehyde oxidase のタンパク質分解メカニズムに関する報告はほとんどない。これらの薬物代謝酵素においても CYP3A タンパク質と同様に化学物質が分解抑制により酵素活性を上昇させる可能性は十分にあり、その詳細なメカニズムを解明することで、薬物代謝酵素に及ぼす影響を統一的に理解し、多様な薬物間相互作用の精度の高い予測を前臨床段階で可能にすることが期待される。



## 実験の部

### I. 試薬

#### ラット初代肝細胞培養

Hanks' Balanced Salts (without  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  and  $\text{NaHCO}_3$ ) : Sigma-Aldrich

EGTA : ナカライテスク株式会社

$\text{NaHCO}_3$  : 関東化学株式会社

Collagenase : 和光純薬工業株式会社

Soybean Trypsin Inhibitor, powder : Thermo Fisher Scientific

1 M HEPES buffer solution : Thermo Fisher Scientific

50 mg/mL Gentamicin : Thermo Fisher Scientific

Bovine serum albumin : ナカライテスク株式会社

$\text{CaCl}_2$  : 関東化学株式会社

$\text{NaCl}$  : 和光純薬工業株式会社

$\text{KCl}$  : ナカライテスク株式会社

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  : ナカライテスク株式会社

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : ナカライテスク株式会社

ソムノペンチル H 注射 : 共立製薬株式会社

40  $\mu\text{m}$  セルストレイナー : BD FALCON

Percoll : Sigma-Aldrich

DMEM/F-12 : Sigma-Aldrich

Fetal bovine serum : Biosera

HEPES : ナカライテスク株式会社

注射用ペニシリン G カリウム 100 万単位 : Meiji Seika ファルマ株式会社

硫酸ストレプトマイシン注射用 1 g : Meiji Seika ファルマ株式会社

L-glutamine : Sigma-Aldrich

Nicotinamide : Sigma-Aldrich

Dexamethasone : ナカライテスク株式会社

2-Mercaptoethanol : ナカライテスク株式会社

L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate : Sigma-Aldrich

Insulin, Human, recombinant : 和光純薬工業株式会社

Trypan blue solution : Sigma-Aldrich

Poly-L-lysine 0.01 % solution : Sigma-Aldrich

Elplasia<sup>TM</sup> SQ 200 50 (24 well plate) : Kuraray

### **Real-time RT-PCR**

AMV Reverse Transcriptase : Promega  
AMV RT 5 × buffer : Promega  
RNase inhibitor : TOYOBO  
dNTP mixture (25 mM each) : Thermo Fisher Scientific  
Dnase I : Promega  
Oligo (dT)<sub>15</sub> primer : Promega  
SV total RNA Isolation system : Promega  
1 × TE buffer : Promega  
Primer 合成委託 : Sigma-Aldrich  
QIAquick® Gel Extraction Kit : QIAGEN  
KAPA™ SYBR® FASTqPCR Kit : 日本ジェネティックス  
Multiplate® PCR plates 96-well white : Bio-Rad Laboratories  
PCR Tube Strips Flat Cap Strips : Bio-Rad Laboratories  
TaKaRa Ex Taq : TaKaRa  
10 × Ex Taq buffer : TaKaRa  
dNTP mixture (2.5 mM each) : TaKaRa  
MicroApp® : Thermo Fisher Scientific  
Nuclease-Free Water : Promega

### **Western Blotting**

30 (w/v) %-Acrylamide/Bis Mixed Solution (37.5:1) : ナカライテスク株式会社  
Tris (hydroxymethyl) aminomethane : 和光純薬工業株式会社  
Sodium Lauryl Sulfate (SDS) : ナカライテスク株式会社  
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) : ナカライテスク株式会社  
Ammonium Peroxodisulfate : ナカライテスク株式会社  
Hydrochloric Acid : 和光純薬工業株式会社  
NaCl : 和光純薬工業株式会社  
Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween® 20) : ナカライテスク株式会社  
Bromophenol blue : ナカライテスク株式会社  
Glycerol : ナカライテスク株式会社  
2-Mercaptoethanol : ナカライテスク株式会社  
Nonidet® P-40 : ナカライテスク株式会社  
Deoxycholic Acid Sodium Salt : ナカライテスク株式会社  
Triton™ X-100 : Sigma-Aldrich  
EDTA 2Na · 2H<sub>2</sub>O : ナカライテスク株式会社

Glycine : ナカライテスク株式会社  
NaF : ナカライテスク株式会社  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> : 和光純薬工業株式会社  
Protease Inhibitor Cocktail for General Use (100x) : ナカライテスク株式会社  
N-Ethylmaleimide : 東京化成工業株式会社  
PVDF membrane : Bio-Rad Laboratories  
Methanol : 関東化学株式会社  
Skim milk : 森永乳業  
Chromatography Paper : GE Healthcare  
Anti-CYP3A1 antibody (AB1253) : Merck Millipore  
Anti-CYP3A1 antibody (sc-53246) : Santacruz Biotechnology  
Anti-CYP3A2 antibody (AB1276) : Merck Millipore  
Anti-GAPDH antibody (G9545) : Sigma-Aldrich  
Anti-gp78-2 antibody (sc-33541) : Santacruz Biotechnology  
Anti-CHIP antibody (sc-66830) : Santacruz Biotechnology  
Anti-ubiquitin antibody (sc-8017) : Santacruz Biotechnology  
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody (A9169) : Sigma-Aldrich  
Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody (A9044) : Sigma-Aldrich  
Normal rabbit IgG (sc-2027) : Santacruz Biotechnology  
Dynabeads® Protein G : Thermo Fisher Scientific  
Pierce™ BCA Protein Assay Kit : Thermo Fisher Scientific  
Chemi-Lumi One L : ナカライテスク株式会社  
Chemi-Lumi One Ultra : ナカライテスク株式会社

#### プロテアソーム活性評価

HEPES : ナカライテスク株式会社  
NaCl : 和光純薬工業株式会社  
MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O : 和光純薬工業株式会社  
EGTA : ナカライテスク株式会社  
Glycerol : ナカライテスク株式会社  
Triton™ X-100 : Sigma-Aldrich  
Dithiothreitol (DTT) : ナカライテスク株式会社  
Adenosine 5'-Triphosphate Disodium Salt n-Hydrate (ATP) : 和光純薬工業株式会社  
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate : Bio-Rad Laboratories  
Proteasome Substrate II, Fluorogenic : Merck Millipore  
Proteasome Substrate III, Fluorogenic : Merck Millipore

Proteasome Substrate VI, Fluorogenic : Merck Millipore

#### 細胞内 GSH 濃度測定

HEPES : ナカライテスク株式会社

NaCl : 和光純薬工業株式会社

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O : 和光純薬工業株式会社

EGTA : ナカライテスク株式会社

Glycerol : ナカライテスク株式会社

Triton™ X-100 : Sigma-Aldrich

Glutathione Cell-Based Detection Kit (Blue Fluorescence) : Cayman chemical

#### CYP3A 酵素活性評価

Tris (hydroxymethyl) aminomethane : 和光純薬工業株式会社

Hydrochloric Acid : 和光純薬工業株式会社

NaCl : 和光純薬工業株式会社

Nonidet® P-40 : ナカライテスク株式会社

Deoxycholic Acid Sodium Salt : ナカライテスク株式会社

Sodium Lauryl Sulfate (SDS) : ナカライテスク株式会社

DMEM/F-12 (without phenol red) : Sigma-Aldrich

P450-Glo™ CYP3A Assay with Luciferin-IPA : Promega

#### 曝露に用いた化合物

2-Acetamidophenol : Sigma-Aldrich

3-Acetamidophenol : Sigma-Aldrich

Acetaminophen : Sigma-Aldrich

4-Acetamidobenzoic acid : Sigma-Aldrich

1-aminobenzotriazole : Sigma-Aldrich

N-acetyl-L-cysteine : Sigma-Aldrich

Cycloheximide : 和光純薬工業株式会社

Z-Leu-Leu-Leu-H aldehyde (MG132) : ペプチド研究所

Dimethyl Sulfoxide : 和光純薬工業株式会社

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Sigma-Aldrich

その他常用試薬は特級グレードのものを使用した。

## II. 分析機器

### Real-Time RT-PCR

Bio-Rad CFX Manager : Bio-Rad Laboratories

Nano Drop 1000 Spectrophotometer : Thermo Fisher Scientific

### Western Blotting

Image Quant Las 4000 mini : GE Healthcare

Enspire™ : PerkinElmer

### プロテアソーム活性評価

Enspire™ : PerkinElmer

### 細胞内 GSH 濃度測定

Enspire™ : PerkinElmer

### CYP3A 酵素活性評価

Enspire™ : PerkinElmer

## III. 実験動物

### ラット (7 週齢)

CD (SD) ラットは日本チャールス・リバー株式会社より 6 週齢を購入した。

## IV. ラット初代肝細胞の培養

CD (SD) 雄性ラット 7 週齢を用いて Two-step collagenase 灌流法 (Berry and Friend, 1969) に従い、ラット初代新鮮肝細胞を単離した。

1. ラットをソムノペンチルで麻酔後、エスミールで全身消毒し、開腹
2. 門脈に留置針を刺し、前灌流液を 30 mL / min で 5 分灌流、直ちに下大静脈を切断
3. コラゲナーゼ液 200 mL で灌流後、肝臓を摘出
4. 肝臓を取り出し、肝細胞をハンクス液中に分散させ、ステンレス細胞濾過器で濾過
5. 700 rpm, 5 分遠心後、細胞を 30 % Percoll 液に再懸濁し、700 rpm, 10 分遠心
6. 最下層にある生細胞を採取し、DMEM/F-12 を用いて wash
7. 40 μm のセルストレイナーに通し、細胞数及び生存率を Trypan blue 法により計測

8. 肝細胞培養メディウムに分散し、 $2.0 \times 10^5$  cells / well となるように播種  
 9. 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 下で培養し、播種 4 時間後に培地を交換し、以後、毎日交換

### 各溶液の組成

#### A) 前灌流液

Ca <sup>2+</sup> free HBSS Powder	9.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
EGTA	0.2 g
50 mg / mL Gentamycin	200 µL
1 M HEPES	10 mL
D.W.	
Total	1000 mL

#### B) コラゲナーゼ液

Ca <sup>2+</sup> free HBSS Powder	9.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
Collagenase	0.1 g
CaCl <sub>2</sub>	0.12 g
50 mg / mL Gentamycin	40 µL
1 M HEPES	2 mL
Trypsin inhibitor	0.01 g
D.W.	
Total	200 mL

#### C) ハンクス液

Ca <sup>2+</sup> free HBSS Powder	9.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
10 % アルブミン液	50 mL
50 mg / mL Gentamycin	100 µL
1 M HEPES	5 mL
D.W.	
Total	500 mL

#### D) 10 × HBSS

Ca <sup>2+</sup> free HBSS Powder	9.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
D.W.	
Total	100 mL

#### E) 30 % Percoll 液

10 × HBSS	5 mL
Percoll	15 mL
D.W.	
Total	100 mL

#### F) 肝細胞培養メディウム

DMEM / F-12	
FCS (10 %)	
L-glutamine (2 mM)	
100 units / mL Penicillin	
100 µg / mL Streptomycin	
Nicotinamide (10 mM)	
β-mercaptoethanol (50 µM)	
Dexametasone (1.5 µM)	
L-ascorbic acid (520 µM)	
Insulin (1 µg / mL)	
HEPES (5 mM)	
Total	500 mL

## V. Real-time RT-PCR

### Total RNA の抽出

SV total RNA Isolation system を使用した。

肝細胞に上記のキットに付属の RNA Lysis buffer を加え、添付の説明書に従い、total RNA を抽出した。

### cDNA の作製

上記で抽出した total RNA に Oligo (dT)<sub>15</sub> primer を 1  $\mu$ L を加えた後、70  $^{\circ}$ C, 5 分で熱変性させ、5 分冷却した後、下記に示す組成で 42  $^{\circ}$ C, 1 時間逆転写反応を行い、75  $^{\circ}$ C, 15 分の間に逆転写反応を失活させた。

#### Reaction mixture

AMV RT 5 $\times$ Reaction buffer	8 $\mu$ L
dNTP mix (25 mM each)	1.6 $\mu$ L
RNase inhibitor (40 units / $\mu$ L)	1 $\mu$ L
AMV reverse transcriptase (10 units / $\mu$ L)	1 $\mu$ L
NF water	27.4 $\mu$ L
RNA (2 $\mu$ g / $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Total	40 $\mu$ L

### PCR 法

TaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup> を使用した。

上記で作製した cDNA および Primer を用いて、下記に示す組成で Thermal cycling parameters に基づき PCR 反応を行った。

#### Reaction mixture

10 $\times$ Ex Taq buffer	2 $\mu$ L
dNTP mix (10 mM)	1.6 $\mu$ L
Primers (Forward and Reverse) (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Ex Taq (5 units / $\mu$ L)	0.05 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L
NF water	14.35 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L

#### Thermal cycling parameters

1. 94 $^{\circ}$ C	20 sec
2. 98 $^{\circ}$ C	20 sec
3. 60 $^{\circ}$ C	30 sec
4. 72 $^{\circ}$ C	40 sec
5. go to line 2 for 24 more times	
6. 72 $^{\circ}$ C	7 min

### Real-Time RT-PCR に用いる検量線の作製

各 Primer を用いて、増幅させた PCR 産物を、1.5 % アガロースゲルに泳動し、QIAquick® Gel Extraction Kit を用いて、ゲルから目的の PCR 産物を抽出した。なお、方法はキット添付の説明書に従った。その抽出物の DNA 吸光度を測定して濃度を算出後、0.1~1000 fg/μL となるように TE buffer で希釈し、検量線とした。

### Real-Time RT-PCR

KAPA™ SYBR® FASTqPCR を使用した。下記に示す組成および Thermal cycle parameters に基づき遺伝子発現量を Bio-RAD CFX Manager を用いて定量、解析した。検量線がある一定の蛍光強度に達するまでに要するサイクル数をもとにサンプルの遺伝子発現量を算出した。

Reaction mixture		Thermal cycling parameters	
KAPA	7.5 μL	1. 95 °C	3 min
Primer (Forward and Reverse) (5 μM)	0.8 μL	2. 95 °C	15 sec
NF water	8.9 μL	3. 60 °C	30 sec
Template cDNA or standard	2 μL	4. 72 °C	30 sec
Total	20 μL	5. go to line 2 for 39 more times	
		6. 60 °C	30 sec
		7. 60 °C	5 sec
		8. 95 °C	0.5 sec

### Primer 配列

β -2-m forward : 5'-CGAGACCGATGTATATGCTTGC-3'

β -2-m reverse : 5'-GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA-3'

CYP3A1/23 forward : 5'-GAAACTGCAGGAGGAGATCG-3'

CYP3A1/23 reverse : 5'-TCACAGTATCATAGGTGGGAGGT-3'

CYP3A2 forward : 5'-CGCTCTCACTAAAGTTCTGCAA-3'

CYP3A2 reverse : 5'-TGGTTCAAGAATTGCTTGTCTACT-3'

CYP3A9 forward : 5'-GGACGATTCTTGCTTACAGG-3'

CYP3A9 reverse : 5'-ATGCTGGTGGGCTTGCCTTC-3'

CYP3A18 forward : 5'-TCCTGTCTCCAACCTTCACC-3'

CYP3A18 reverse : 5'-CACTCGGTTCTTCTGGTTTG-3'

gp78 forward : 5'-TGGAAGCCAGGTTTGCCGTT-3'

gp78 reverse : 5'-ATGAACGAAGGCAGGAGTTGTG-3'



## VI. Western blotting

### SDS-PAGE サンプル調製

RIPA buffer		2 × sample buffer	
	Final		Final
Tris-HCl (pH 7.6)	25 mM	Tris-HCl (pH 6.8)	100 mM
NaCl	150 mM	SDS	4 %
Nonidet® P-40	1 %	Bromophenol blue	0.004 %
Deoxycholic Acid Sodium Salt	1 %	Glycerol	20 %
SDS	0.1 %	2-Mercaptoethanol	5 %
D.W		D.W	
Total	50 mL	Total	100 mL

培養しているメディウムを除去し、PBS (-) で wash (2 回) した後、RIPA buffer (with 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>Vo<sub>4</sub>, 1/100 Protease Inhibitor Cocktail) にて肝細胞スフェロイドを 1 sample / 4 well / 400 µL で回収した。超音波処理を行い、15,000 rpm, 4 °C、20 min の条件下で遠心した後、遠心上清と等量の 2 × sample buffer を混合し、ヒートブロックを用いて 95 °C, 3 min 加熱させ、サンプルとした。

### サンプルのタンパク定量

上記の遠心上清を D.W. を用いて 5 倍希釈し、Pierce™ BCA Protein Assay Kit の説明書に従い測定サンプルを調製した後、Enspire™ にて 562 nm の吸光度を測定し、サンプル中のタンパク質濃度を算出した。検量線として Kit に付属している bovine serum albumin standard を用いた。

### Western blotting

10 × TBS		TBS-T	
	Final		
Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM	10 × TBS	100 mL
NaCl	1.5 M	Tween® 20	1 mL
D.W		D.W	
Total	1 L	Total	1 L

1. 調製したサンプルを 10 % アクリルアミド分離ゲル, 5 % アクリルアミド濃縮ゲルにアブライ
2. Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) を用いて 200 V, 40 min の条件下で泳動 (ゲル 2 枚当たり)

- 泳動用 buffer : Running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 1 % SDS)
3. Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) を用いて  
親水化した PVDF 膜に 100 V, 1.5 h の条件下で転写  
転写用 buffer : Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 7.5 % MeOH)  
親水化 : MeOH 20 sec → D.W. 1 min → Transfer buffer 20 min
4. 転写された PVDF 膜を 5 % skim milk (in TBS-T) で blocking (室温、1 h)
5. 一次抗体溶液中で振とう (4 °C、overnight)
6. TBS-T で wash (3 回) した後、HRP 標識した二次抗体溶液中で振とう (室温、1 h)
7. TBS-T で wash (3 回) した後、Chemi-Lumi One L または Chemi-Lumi One Ultra  
により反応させ、その化学発光を Image Quant Las 4000 mini で検出
8. Image J を用いてバンドの強度を定量

### 免疫沈降

Immunoprecipitation buffer	
	Final
Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM
Triton™ X-100	1 %
Deoxycholic Acid Sodium Salt	1 %
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM
Glycerol	20 %
D.W	
Total	50 mL

1. Dynabeads® Protein G (50 µl) を 1.5 ml tube に移し、マグネット上で上清を除去
2. 1×PBS-T (PBS with 0.1 % Tween® 20) で wash (1 回)
3. 1×PBS-T (200 µl) に Anti-CYP3A1 antibody (AB1253) と Normal rabbit IgG (sc-2027) をそれぞれ 2, 4 µl 溶解したものと Dynabeads® Protein G をインキュベーション(室温、30 min, ローテーション)
4. マグネット上で上清を除去し、1×PBS-T (600 µl) に 400 µg protein / sample となるように上記の buffer で回収した上清を溶解したものと Dynabeads® Protein G をインキュベーション (室温、2 h, ローテーション)
5. マグネット上で上清を除去し、1×PBS-T で wash (3 回)
6. マグネット上で上清を除去し、1×PBS-T (100 µl) に再懸濁後、新しい 1.5 ml tube に移す
7. マグネット上で上清を除去し、2×sample buffer (20 µl) を加え、95 °C 3 min 加熱し、サンプルを調製

## 抗体

抗 CYP3A1 抗体 (AB1253)

タンパク量 : 5 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 5000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 10000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

抗 CYP3A1 抗体 (sc-53246)

タンパク量 : 10 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 1000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 5000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

抗 CYP3A2 抗体 (AB1276)

タンパク量 : 5 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 5000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 10000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

抗 GAPDH 抗体 (G9545)

タンパク量 : 5 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 10000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 10000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

抗 gp78-2 抗体 (sc-33541)

タンパク量 : 10 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 1000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 5000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

抗 CHIP 抗体 (sc-66830)

タンパク量 : 10 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 1000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 5000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

抗 Ubiquitin 抗体 (sc-8017)

タンパク量 : 10 µg

ブロッキング : 5 % skim milk (in TBS-T) を用いて室温、1 h

一次抗体 : 5 % skim milk (in TBS-T) で 1000 倍希釈し、4 °C、overnight 振とう

二次抗体 : Anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody を 5 % skim milk (in TBS-T) で 5000 倍希釈し、室温、1 h 振とう

## VII. プロテアソーム活性評価

Cell lysis buffer		基質
	Final	
HEPES	50 mM	Proteasome Substrate II (Z-LLE-AMC) : caspase-like activity
NaCl	150 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	Proteasome Substrate III (Suc-LLVY-AMC) : chymotrypsin-like activity
EGTA	1 mM	
Glycerol	10 %	
Triton™ X-100	1 %	
ATP(用時調製)	5 mM	Proteasome Substrate VI (Z-ARR-ANC) : trypsin-like activity
DTT(用時調製)	0.5 mM	
D.W		
Total	50 mL	

1. 各化合物を曝露後、メディウムを除去し PBS (-) で wash (2 回)
2. 上記の Cell lysis buffer にて肝細胞スフェロイドを 1 sample / 3 well / 400 µL で回収後、12,000 rpm, 4 °C、10 min の条件下で遠心
3. 遠心上清 (30 µl) を 96 well black plate へ移し、5 mM に調製した各 20 S Proteasome Substrate (1.25 µl) を加えて、37 °C、30 min インキュベーション
4. 蛍光強度を Enspire™ により測定 (Ex : 355 nm, Em : 460 nm)
5. 残りの遠心上清を Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate を用いてタンパク定量し、蛍光強度を補正

## VIII. 細胞内 GSH 濃度測定

Cell lysis buffer	
	Final
HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
EGTA	1 mM
Glycerol	10 %
Triton™ X-100	1 %
D.W	
Total	50 mL

1. 各化合物を曝露後、メディウムを除去し PBS (-) で wash (2 回)
2. 上記の Cell lysis buffer にて肝細胞スフェロイドを 1 sample / 1 well / 400 µL で回収後、7,000 rpm, 4 °C、10 min の条件下で遠心
3. 遠心上清 (90 µl) を 96 well black plate へ移し、Glutathione Cell-Based Detection Kit (Blue Fluorescence) の説明書に従い測定サンプルを調製した後、室温、1.5 h インキュベーション (遮光)
4. 蛍光強度を Enspire™ により測定 (Ex : 380 nm, Em : 460 nm)

## IX. CYP3A 酵素活性評価

1. 各化合物を曝露後、メディウムを除去し PBS (-) で wash (2 回)
2. P450-Glo™ CYP3A Assay with Luciferin-IPA に付属している Luciferin-IPA (3 µM) を DMEM/F-12 (without phenol red) に溶解し、300 µl / well で肝細胞スフェロイドに曝露後 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 下でインキュベーション
3. メディウム上清 (50 µl) を 96 well white plate へ移し、Kit に付属している Detection Reagent (50 µl) を加えて室温、20 min インキュベーション (遮光)
4. 発光強度を Enspire™ により測定
5. 残りのメディウムを除去し、PBS (-) で wash (2 回) した後、RIPA buffer でタンパク質を回収、定量して、酵素活性を補正

## X. PAcBA のナトリウム塩化

1. PAcBA を EtOH に溶解 (Final : 10 mM)
2. 半等量の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて、スターラーで攪拌 (室温、2 h)
3. ろ紙でろ過した後、減圧乾固

4. 得られた紛体を EtOH に溶解し、再び減圧乾固
5. 得られた紛体をアセトンに懸濁し、未反応の PAcBA を溶解
6. 吸引ろ過を行い、ナトリウム塩を得た後、減圧ろ過（室温、overnight）

## 引用文献

Acharya P, Liao M, Engel JC, Correia MA. Liver cytochrome P450 3A endoplasmic reticulum-associated degradation: a major role for the p97 AAA ATPase in cytochrome P450 3A extraction into the cytosol. *J Biol Chem*. 2011; **286**(5):3815-28.

Ahn T, Yun CH. High-level expression of human cytochrome P450 3A4 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1 (Hsp40). *Arch Pharm Res*. 2004; **27**(3):319-23.

Aiba T, Takehara Y, Okuno M, Hashimoto Y. Poor correlation between intestinal and hepatic metabolic rates of CYP3A4 substrates in rats. *Pharm Res*. 2003; **20**(5):745-48.

Banerjee A, Kocarek TA, Novak RF. Identification of a ubiquitination-Target/Substrate-interaction domain of cytochrome P-450 (CYP) 2E1. *Drug Metab Dispos*. 2000; **28**(2):118-24.

Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*. 1969; **43**(3):506-20.

Cerny MA. Prevalence of Non-Cytochrome P450-Mediated Metabolism in Food and Drug Administration-Approved Oral and Intravenous Drugs: 2006-2015. *Drug Metab Dispos*. 2016; **44**(8):1246-52.

Chen B, Mariano J, Tsai YC, Chan AH, Cohen M, Weissman AM. The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103**(2):341-46.

Chen W, Koenigs LL, Thompson SJ, Peter RM, Rettie AE, Trager WF, Nelson SD. Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chem Res Toxicol*. 1998; **11**(4):295-301.

Chen Z, Ballar P, Fu Y, Luo J, Du S, Fang S. The E3 ubiquitin ligase gp78 protects

against ER stress in zebrafish liver. *J Genet Genomics*. 2014; **41**(7):357-68.

Cheng J, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Rifampicin-activated human pregnane X receptor and CYP3A4 induction enhance acetaminophen-induced toxicity. *Drug Metab Dispos*. 2009; **37**(8):1611-21.

Christianson JC, Ye Y. Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; **21**(4):325-35.

Cohen-Kaplan V, Livneh I, Avni N, Cohen-Rosenzweig C, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; **79**:403-418.

Correia MA, Decker C, Sugiyama K, Caldera P, Bornheim L, Wrighton SA, Rettie AE, Trager WF. Degradation of rat hepatic cytochrome P-450 heme by 3,5-dicarbethoxy-2,6-dimethyl-4-ethyl-1,4-dihydropyridine to irreversibly bound protein adducts. *Arch Biochem Biophys*. 1987; **258**(2):436-51.

Correia MA. Cytochrome P450 turnover. *Methods Enzymol*. 1991; **206**:315-25.

Correia MA. Hepatic cytochrome P450 degradation: mechanistic diversity of the cellular sanitation brigade. *Drug Metab Rev*. 2003; **35**(2-3):107-43.

Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; **81**(5):1327-31.

Dash A, Inman W, Hoffmaster K, Sevidal S, Kelly J, Obach RS, Griffith LG, Tannenbaum SR. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009; **5**(10):1159-74.

Davydov DR, Davydova NY, Sineva EV, Kufareva I, Halpert JR. Pivotal role of P450-P450 interactions in CYP3A4 allostery: the case of  $\alpha$ -naphthoflavone. *Biochem J*. 2013; **453**(2):219-30.

Dhir RN, Dworakowski W, Thangavel C, Shapiro BH. Sexually dimorphic regulation



of hepatic isoforms of human cytochrome p450 by growth hormone. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; **316**(1):87-94.

Fang S, Ferrone M, Yang C, Jensen JP, Tiwari S, Weissman AM. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; **98**(25):14422-27.

Faouzi S, Medzihradszky KF, Hefner C, Maher JJ, Correia MA. Characterization of the physiological turnover of native and inactivated cytochromes P450 3A in cultured rat hepatocytes: a role for the cytosolic AAA ATPase p97? *Biochemistry.* 2007; **46**(26):7793-803.

Gonzalez FJ. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos.* 2007; **35**(1):1-8.

Gómez-Lechón MJ, Lahoz A, Gombau L, Castell JV, Donato MT. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des.* 2010; **16**(17):1963-77.

Hadi M, Dragovic S, van Swelm R, Herpers B, van de Water B, Russel FG, Commandeur JN, Groothuis GM. AMAP, the alleged non-toxic isomer of acetaminophen, is toxic in rat and human liver. *Arch Toxicol.* 2013; **87**(1):155-65.

Hamilton M, Kissinger PT. The metabolism of 2- and 3-hydroxyacetanilide. Determination of metabolic products by liquid chromatography/electrochemistry. *Drug Metab Dispos.* 1986; **14**(1):5-12.

Harrelson JP, Stamper BD, Chapman JD, Goodlett DR, Nelson SD. Covalent modification and time-dependent inhibition of human CYP2E1 by the meta-isomer of acetaminophen. *Drug Metab Dispos.* 2012; **40**(8):1460-65.

Hazai E, Vereczkey L, Monostory K. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **291**(4):1089-94.

Hoehn PA, Commandeur JN, Vermeulen NP, Van Berkel TJ, Bijsterbosch MK. Selective induction of cytochrome P450 3A1 by dexamethasone in cultured rat hepatocytes: analysis with a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction

assay section sign. *Biochem Pharmacol.* 2000; **60**(10):1509-18.

James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2003; **31**(12):1499-506.

Kawai M, Bandiera SM, Chang TK, Bellward GD. Growth hormone regulation and developmental expression of rat hepatic CYP3A18, CYP3A9, and CYP3A2. *Biochem Pharmacol.* 2000; **59**(10):1277-87.

Kim SJ, Lee MY, Kwon DY, Kim SY, Kim YC. Alteration in metabolism and toxicity of acetaminophen upon repeated administration in rats. *J Pharmacol Sci.* 2009; **111**(2):175-81.

Kim SM, Acharya P, Engel JC, Correia MA. Liver cytochrome P450 3A ubiquitination in vivo by gp78/autocrine motility factor receptor and C terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) E3 ubiquitin ligases: physiological and pharmacological relevance. *J Biol Chem.* 2010; **285**(46):35866-77.

Kim SM, Wang Y, Nabavi N, Liu Y, Correia MA. Hepatic cytochromes P450: structural degons and barcodes, posttranslational modifications and cellular adapters in the ERAD-endgame. *Drug Metab Rev.* 2016; **48**(3):405-33.

Kim SN, Seo JY, Jung DW, Lee MY, Jung YS, Kim YC. Induction of hepatic CYP2E1 by a subtoxic dose of acetaminophen in rats: increase in dichloromethane metabolism and carboxyhemoglobin elevation. *Drug Metab Dispos.* 2007; **35**(10):1754-58.

Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004; **3**(8):711-15.

Laine JE, Auriola S, Pasanen M, Juvonen RO. Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica.* 2009; **39**(1):11-21.

Li L, Gao G, Shankar J, Joshi B, Foster LJ, Nabi IR. p38 MAP kinase-dependent phosphorylation of the Gp78 E3 ubiquitin ligase controls ER-mitochondria association and mitochondria motility. *Mol Biol Cell.* 2015; **26**(21):3828-40.

Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E, Gan LS. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2002; **30**(7):795-804.

Mahnke A, Strotkamp D, Roos PH, Hanstein WG, Chabot GG, Nef P. Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 1997; **337**(1):62-68.

Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; **2**(6):875-94.

Meng Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010; **6**(6):733-46.

Mobasher MA, González-Rodríguez A, Santamaría B, Ramos S, Martín MÁ, Goya L, Rada P, Letzig L, James LP, Cuadrado A, Martín-Pérez J, Simpson KJ, Muntané J, Valverde AM. Protein tyrosine phosphatase 1B modulates GSK3 $\beta$ /Nrf2 and IGFIR signaling pathways in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Cell Death Dis.* 2013; **4**:e626.

Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol.* 2010; **79**(7):1045-52.

Morishima Y, Peng HM, Lin HL, Hollenberg PF, Sunahara RK, Osawa Y, Pratt WB. Regulation of cytochrome P450 2E1 by heat shock protein 90-dependent stabilization and CHIP-dependent proteasomal degradation. *Biochemistry.* 2005; **44**(49):16333-40.

Morito D, Hirao K, Oda Y, Hosokawa N, Tokunaga F, Cyr DM, Tanaka K, Iwai K, Nagata K. Gp78 cooperates with RMA1 in endoplasmic reticulum-associated degradation of CFTR $\Delta$ F508. *Mol Biol Cell.* 2008; **19**(4):1328-36.

Mutoh S, Sobhany M, Moore R, Perera L, Pedersen L, Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR)

by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci Signal*. 2013; **6**(274):ra31.

Ni HM, Bockus A, Boggess N, Jaeschke H, Ding WX. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*. 2012; **55**(1):222-32.

Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Terasaki T. Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos*. 2012; **40**(1):83-92.

Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Yang CS. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol*. 1993; **6**(4):511-18.

Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL. Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Biol Chem*. 1998; **273**(28):17940-53.

Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL. Identification of hepatic protein targets of the reactive metabolites of the non-hepatotoxic regioisomer of acetaminophen, 3'-hydroxyacetanilide, in the mouse in vivo using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Adv Exp Med Biol*. 2001; **500**:663-73.

Rashed MS, Myers TG, Nelson SD. Hepatic protein arylation, glutathione depletion, and metabolite profiles of acetaminophen and a non-hepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in the mouse. *Drug Metab Dispos*. 1990; **18**(5):765-70.

Ribeiro V, Lechner MC. Cloning and characterization of a novel CYP3A1 allelic variant: analysis of CYP3A1 and CYP3A2 sex-hormone-dependent expression reveals that the CYP3A2 gene is regulated by testosterone. *Arch Biochem Biophys*. 1992; **293**(1):147-52.

Richert L, Tuschl G, Abadie C, Blanchard N, Pekthong D, Manton G, Weber JC,

Mueller SO. Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; **235**(1):86-96.

Roberts BJ, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J Biol Chem*. 1995; **270**(50):29632-35.

Roberts BJ Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation. *J Biol Chem*. 1997; **272**(15):9771-78.

Robertson GR, Farrell GC, Liddle C. Sexually dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; **242**(1):57-60.

Ronis MJ, Johansson I, Hultenby K, Lagercrantz J, Glaumann H, Ingelman-Sundberg M. Acetone-regulated synthesis and degradation of cytochrome P450E1 and cytochrome P4502B1 in rat liver. *Eur J Biochem*. 1991; **198**(2):383-89.

Root AW, Duckett G, Sweetland M, Reiter EO. Effects of zinc deficiency upon pituitary function in sexually mature and immature male rats. *J Nutr*. 1979; **109**(6):958-64.

Rottero AE, Kissinger P. Detection and identification of three thioether conjugates of 2-hydroxyacetanilide by liquid chromatography/electrochemistry. *Biomed Chromatogr*. 1987; **2**(1):24-29.

Saberi B, Ybanez MD, Johnson HS, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Protein kinase C (PKC) participates in acetaminophen hepatotoxicity through c-jun-N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent signaling pathways. *Hepatology*. 2014; **59**(4):1543-54.

Sanoh S, Santoh M, Takagi M, Kanayama T, Sugihara K, Kotake Y, Ejiri Y, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Fluorometric assessment of acetaminophen-induced toxicity in rat hepatocyte spheroids seeded on micro-space cell culture plates. *Toxicol In Vitro*. 2014; **28**(6):1176-82.

Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K,

Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica*. 2015; **45**(7):605-14.

Shiraki H, Guengerich FP. Turnover of membrane proteins: kinetics of induction and degradation of seven forms of rat liver microsomal cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys*. 1984; **235**(1):86-96.

Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem*. 1989; **264**(6):3568-72.

St-Pierre P, Dang T, Joshi B, Nabi IR. Peripheral endoplasmic reticulum localization of the Gp78 ubiquitin ligase activity. *J Cell Sci*. 2012; **125**(7):1727-37.

Streeter AJ, Bjorge SM, Axworthy DB, Nelson SD, Baillie TA. The microsomal metabolism and site of covalent binding to protein of 3'-hydroxyacetanilide, a nonhepatotoxic positional isomer of acetaminophen. *Drug Metab Dispos*. 1984; **12**(5):565-76.

Streeter AJ, Baillie TA. 2-Acetamido-p-benzoquinone: a reactive arylating metabolite of 3'-hydroxyacetanilide. *Biochem Pharmacol*. 1985; **34**(16):2871-76.

Takagi M, Sanoh S, Santoh M, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S. Detection of metabolic activation leading to drug-induced phospholipidosis in rat hepatocyte spheroids. *J Toxicol Sci*. 2016; **41**(1):155-64.

Thummel KE, Lee CA, Kunze KL, Nelson SD, Slattery JT. Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem Pharmacol*. 1993; **45**(8):1563-69.

Vilchez D, Saez I, Dillin A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun*. 2014; **5**:5659.

Wang Y, Liao M, Hoe N, Acharya P, Deng C, Krutchinsky AN, Correia MA. A role for

protein phosphorylation in cytochrome P450 3A4 ubiquitin-dependent proteasomal degradation. *J Biol Chem*. 2009; **284**(9):5671-84.

Wang Y, Guan S, Acharya P, Koop DR, Liu Y, Liao M, Burlingame AL, Correia MA. Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of human liver cytochrome P450 2E1: identification of sites targeted for phosphorylation and ubiquitination. *J Biol Chem*. 2011; **286**(11):9443-56.

Wang Y, Guan S, Acharya P, Liu Y, Thirumaran RK, Brandman R, Schuetz EG, Burlingame AL, Correia MA. Multisite phosphorylation of human liver cytochrome P450 3A4 enhances its gp78- and CHIP-mediated ubiquitination: a pivotal role of its Ser-478 residue in the gp78-catalyzed reaction. *Mol Cell Proteomics*. 2012; **11**(2):M111.010132

Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, Pairaudeau G, Pennie WD, Pickett SD, Wang J, Wallace O, Weir A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; **14**(7):475-86.

Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem*. 1986; **261**(14):6264-71.

Waxman DJ, Pampori NA, Ram PA, Agrawal AK, Shapiro BH. Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; **88**(15):6868-72.

Wolf KK, Wood SG, Hunt JA, Walton-Strong BW, Yasuda K, Lan L, Duan SX, Hao Q, Wrighton SA, Jeffery EH, Evans RM, Szakacs JG, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH, Schuetz EG, Sinclair PR, Sinclair JF. Role of the nuclear receptor pregnane X receptor in acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2005; **33**(12):1827-36.

Xie Y, McGill MR, Du K, Dorko K, Kumer SC, Schmitt TM, Ding WX, Jaeschke H. Mitochondrial protein adducts formation and mitochondrial dysfunction during

*N*-acetyl-*m*-aminophenol (AMAP)-induced hepatotoxicity in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; **289**(2):213-22.

Xu Z, Kawai M, Bandiera SM, Chang TK. Influence of dietary zinc deficiency during development on hepatic CYP2C11, CYP2C12, CYP3A2, CYP3A9, and CYP3A18 expression in postpubertal male rats. *Biochem Pharmacol*. 2001; **62**(9):1283-91.

Yang K, Koh KH, Jeong H. Induction of CYP2B6 and CYP3A4 expression by 1-aminobenzotriazole (ABT) in human hepatocytes. *Drug Metab Lett*. 2010; **4**(3):129-33.

Zangar RC, Novak RF. Posttranslational elevation of cytochrome P450 3A levels and activity by dimethyl sulfoxide. *Arch Biochem Biophys*. 1998; **353**(1):1-9.

Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004; **199**(3):316-31.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013; **138**(1):103-41.

Zhang J, Huang W, Chua SS, Wei P, Moore DD. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science*. 2002; **298**(5592):422-24.

Zhukov A, Ingelman-Sundberg M. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem J*. 1999; **340**(2):453-58.



## 本論文の基礎となる原著

Santoh M, Sanoh S, Takagi M, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S.

Acetaminophen induces accumulation of functional rat CYP3A via polyubiquitination dysfunction. *Sci. Rep.* 2016; **6**, 21373; doi: 10.1038/srep21373.

## 本論文に関連した学会発表

2014 年 10 月 19 ～ 23 日 (21 日発表)

The 19<sup>th</sup> North American ISSX and 29<sup>th</sup> JSSX Meeting San Francisco

演題 : COMPARISON OF THE CORRELATION BETWEEN CYP3A ACTIVITY AND  
PROTEIN EXPRESSION IN SPHEROID AND MOLOYAER CULTURE

○Masataka Santoh, Seigo Sanoh, Masashi, Takagi, Yoko Ejiri, Shigeru Ohta

19<sup>th</sup> North American ISSX and 29<sup>th</sup> JSSX Meeting Travel Grant 2014 受賞

2015 年 11 月 12 ～14 日 (12 日発表)

日本薬物動態学会 第 30 回年会 東京

演題 : Acetaminophen induces the accumulation of functional rat CYP3A by inhibition  
of the ubiquitin-proteasome system

○Masataka Santoh, Seigo Sanoh, Masashi, Takagi, Yoko Ejiri, Yaichiro Kotake,  
Shigeru Ohta

2016 年 6 月 12 ～ 16 日 (13 日発表)

The 11<sup>th</sup> International ISSX Meeting Busan

演題 : ACETAMINOPHEN INDUCES ACCUMULATION OF FUNCTIONAL RAT  
CYP3A BY ALTERING GP78 LOCALIZATION

○Masataka Santoh, Seigo Sanoh, Masashi, Takagi, Yoko Ejiri, Yaichiro Kotake,  
Shigeru Ohta

## 謝辞

本研究を行うにあたり、幅広い見地・経験から御指導、御鞭撻を賜りました 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 太田 茂 教授 に心から御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なる直接の御指導並びに多大なるご助言を頂きました 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 佐能 正剛 助教 に心から大変深く感謝し、御礼申し上げます。

そして、本研究に際して、数々の御助言・御協力を頂きました、広島大学大学院医歯薬保健学研究院 古武 弥一郎 准教授 に厚く御礼申し上げます。

本研究において審査、御助言を賜りました 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 高野 幹久 教授、同研究院 森岡 徳光 教授、同研究院 細井 徹 准教授 に深謝致します。

本研究の遂行に際して、御協力頂きました 株式会社クラレ 江尻 洋子 先生 始め皆様に御礼申しあげます。

経済的支援に際して、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金を賜りました 公益社団法人日本薬学会 に深く感謝し、御礼申し上げます。

そして、本研究に御協力頂き、学生生活を楽しく、充実した時間にしてくれた 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 生体機能分子動態学研究室 の諸先輩方、同級生、後輩の皆さんに心から感謝申し上げます。

最後に、このような勉強する環境を与え、支えてくれた家族に心から感謝致します。